

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES INJECTIONS RÉPÉTÉES DE BCG SUR LES SINGES

par les Drs I. M. LÉVITAN et D. D. LOKHOFF.

(Clinique thérapeutique de l'Académie médicale militaire de Leningrad : Directeur : Professeur E. A. GRANDSTRÖM, et de l'Institut des Sciences pratiques : Directeur : Professeur I. A. MENDELEFF, section d'anatomie pathologique).

Étudiant expérimentalement depuis plusieurs années les effets des injections de BCG (1) sur l'organisme tuberculeux, il nous a paru naturellement désirable de continuer nos expériences sur des animaux se rapprochant biologiquement de l'homme.

Grâce à l'obligeance de l'administration du Jardin Zoologique de Leningrad, nous avons eu la possibilité de faire nos essais sur plusieurs singes atteints spontanément de tuberculose, ce qui arrive très souvent dans nos conditions climatiques. Pour des raisons faciles à comprendre, nos expériences n'ont pu porter que sur un petit nombre d'animaux; nous avons donc ainsi disposé de 5 singes. Nous n'avons pas fait d'épreuves vérificatrices quant à l'innocuité du BCG sur les singes, estimant

qu'il existe suffisamment de données dans la littérature à ce sujet (Calmette, Wilbert, Kraus, Mouquet, A. S. Griffith, etc.).

Le premier, « Abrachka » (un drill mâle), nous est parvenu déjà très malade et a succombé très vite. Il nous a servi à étudier les effets de la tuberculose chez les singes. A l'autopsie nous avons constaté une pneumonie caséuse totale du poumon droit et une tuberculose caséuse très nette de tous les ganglions lymphatiques du médiastin. L'aspect général rappelait la tuberculose humaine de l'enfance.

Le second singe, « Zina » (une femelle drill), contaminé par le singe précédent par cohabitation dans une même cage pendant un an, nous est également parvenu en très mauvais état pour nos essais. Cliniquement ce singe présentait de la toux, de la dyspnée, des frissons le soir, de l'apathie, un mauvais appétit. Nous lui avons inoculé sous la peau 1/50 de milligramme de BCG. Nous n'avons observé aucune réaction au point d'inoculation, mais il était difficile de faire des observations en cage sur cet animal très sauvage. Vers le soir, après l'inoculation, son état a empiré, le singe se déplaçait à peine, restant plutôt couché. Le lendemain, le tableau clinique était le même qu'avant l'injection. L'animal a succombé deux semaines plus tard, avec tous les symptômes d'une pneumonie caséuse, avec tuberculose miliaire du foie, de la rate et des reins. Dans ce cas, l'inoculation unique du BCG n'a pu influencer en aucune manière le cours ni le terme du processus. On devait s'y attendre en raison de la gravité de la maladie. En tout cas nous n'avons pas constaté d'aggravation.

Comparant ces deux faits avec nos expériences précédentes sur les lapins et les cobayes, nous pouvons conclure que l'introduction du BCG dans un organisme tuberculeux est inoffensive. L'absence de réaction au point d'inoculation s'explique peut-être par l'extrême état de cachexie du singe.

Le troisième singe, « Maroussia » (femelle drill), a cohabité dans une même cage pendant presque un an avec un mâle babouin mort de tuberculose. Comme symptômes cliniques, nous avons observé de l'apathie, un mauvais appétit, de la toux, ce qui a été mis sur le compte de la tuberculose.

Nous n'avons observé aucune réaction après une première injection de BCG de 1/50 de milligramme sous la peau. Peu

après, le singe se remettait et une deuxième injection à dose égale lui était faite. Cette fois-ci nous avons noté pendant deux jours une certaine aggravation de l'état général, puis tout est rentré dans l'ordre. Une troisième injection faite quatre mois plus tard a provoqué l'apparition de taches rouges sur la peau de la poitrine et un frisson quatre heures après. Pendant les deux jours suivants, nous avons observé une certaine apathie. Un mois après, rechute avec terminaison mortelle en huit jours. A l'autopsie nous n'avons trouvé aucun signe de tuberculose. La mort avait été causée par une colite ulcéreuse compliquée de pneumonie muco-purulente. On trouve signalés dans la littérature des cas de maladies spontanées auxquelles a été attribuée une recrudescence de la virulence du BCG (Hormaçhe), et cependant, en fait, on n'a jamais observé de modifications quelconques dues à l'effet du BCG, pas plus qu'à la recrudescence de sa virulence, ainsi qu'en témoignent les publications de beaucoup d'autres auteurs (Pierre Mauriac et C. Aubertin, A. Saenz, etc.).

Le quatrième singe, « Marguerite » (femelle cercopithèque), nous avait été remis par le Jardin Zoologique comme suspect de tuberculose, qui paraissait se traduire cliniquement par une toux légère, des frissons le soir, une certaine apathie, un mauvais appétit. Nous avons observé étroitement ce singe durant quatre cent soixante-dix-sept jours. Pendant trois cent trente-huit jours il a reçu 10 injections de BCG à intervalles d'un mois, à la dose de $1/500$ de milligramme sous la peau. Pendant tout le cours de nos observations, l'état de l'animal est resté en général satisfaisant, avec certaines oscillations dépendant de la saison et des conditions alimentaires. Les symptômes visibles de la maladie n'apparurent qu'un mois et demi environ avant la mort, se manifestant cliniquement par de la bronchite (toux et, à l'auscultation, respiration rude, râles secs et crépitants), de la pneumonie avancée, de la dyspnée, de la toux, de la cyanose. Aucune réaction forte de température. Durant les cinq premiers mois, le poids de l'animal augmenta, puis il a diminué peu à peu et à sa mort la perte de poids était d'environ 500 grammes (c'est-à-dire 27 p. 100 de son poids normal). La radiographie, faite deux mois et demi avant la mort, montrait des foyers disséminés dans les poumons, donnant le droit de

suspecter la présence d'un processus tuberculeux. Le vaccin BCG avait été introduit sous la peau des membres inférieurs aux doses de 1/500 de milligramme. Les vaccinations ont commencé à être faites onze mois avant la mort, à des intervalles d'un mois environ, de telle sorte que l'animal a reçu en tout 10 injections. Au point d'inoculation, nous n'avons observé aucune modification, sauf une seule fois une légère infiltration vite résorbée. Après les injections, pendant deux à cinq jours, nous avons noté une dépression très prononcée, mauvais appétit, un frisson dans les deux ou quatre heures et une légère élévation de température.

Les épreuves tuberculiniques, répétées avec des concentrations différentes en ophtalmo, cuti et intradermo, sont restées négatives avant et après les inoculations.

A l'autopsie de ce singe nous avons trouvé un amaigrissement très marqué, de l'hyperplasie des ganglions lymphatiques et des phénomènes de pneumonie catarrhale. Pas d'altérations tuberculeuses, ni macroscopiques, ni microscopiques.

Ici également, les injections répétées de BCG se sont montrées inoffensives. Et comme nous l'avons déjà indiqué dans les cas précédents, ni les injections répétées, ni les maladies survenues fortuitement et spontanément n'ont, d'aucune manière, accru la virulence du vaccin.

Les mauvaises conditions vitales marquées par un amaigrissement progressif avant la mort n'ont pas davantage influencé les propriétés biologiques du vaccin.

Le dernier singe, « Pierre » (mâle cercopithèque), nous a été également remis par le Jardin Zoologique comme étant atteint de tuberculose. Comme symptômes cliniques il présentait une légère toux, de la dépression et un mauvais appétit.

Nous avons gardé ce singe en observation pendant six cent vingt-sept jours. Durant les cinq cent vingt-neuf derniers jours, il a reçu 13 injections de BCG. Pendant tout ce temps il a fait des phénomènes d'emphysème et de bronchite, avec toux, dyspnée et légère cyanose. Faibles oscillations thermiques. Pendant la première année, le poids de l'animal s'est maintenu à peu près le même, puis il a commencé à baisser et est tombé jusqu'à 700 grammes (26 p. 100 de son poids normal) le jour de sa mort.

La radiographie prise onze mois avant la mort montrait de

l'emphysème à la base des poumons et de la péribronchite. Les injections de BCG faites aux mêmes doses, à des intervalles semblables à ceux des cas précédents, ont été accompagnées des mêmes manifestations. Les réactions à la tuberculine ont été également négatives avant et après la vaccination.

Deux semaines après la 13^{ème} injection de BCG, le singe fut infecté avec une culture virulente de tuberculose (*T. humanus*) par inoculation, sous la peau du membre inférieur, d'une dose de 1/100.000^e de milligramme. Nous n'avons observé aucune réaction, ni locale, ni générale.

Au soixante-dix-neuvième jour après l'infection nous avons été obligés (à cause de difficultés techniques) de terminer nos observations et l'animal fut sacrifié par chloroformisation. Voici les résultats de son autopsie :

Macroscopiquement, l'amaigrissement mis à part, aucune modification.

Microscopiquement, hyperplasie des follicules lymphatiques, des ganglions lymphatiques, de la rate et du trajet des bronches aux poumons.

Aucun signe de tuberculose ni de péribronchite.

Dans ce cas également les injections répétées de BCG ont montré leur parfaite innocuité et n'ont pas augmenté la virulence du vaccin ; bien au contraire, elles ont accru la résistance de l'organisme contre l'infection virulente d'épreuve, et cela, malgré des difficultés croissantes d'entretien et d'alimentation. L'animal n'a subi qu'une déperdition, d'ailleurs notable, de poids.

CONCLUSIONS.

1° Les vaccinations BCG répétées chez les singes sont absolument inoffensives.

2° Elles confèrent une augmentation nette de résistance aux infections virulentes ultérieurement réalisées.

3° Les vaccinations répétées, les maladies spontanées, les mauvaises conditions d'alimentation n'accroissent pas la virulence du BCG.

4° L'emploi du BCG chez les singes tuberculeux n'exerce aucune action nuisible sur l'évolution du processus tuberculeux virulent.

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DU DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE
DE LA DIPHTÉRIE

par E. PIASECKA-ZEYLAND.

(*Institut de Microbiologie médicale,*
Directeur Professeur L. PADLEWSKI, Université de Poznan,
Pologne.)

Depuis la découverte, faite en 1884 par Löffler, des bacilles diphtériques et de leur culture sur sérum coagulé, on se sert de cette méthode de diagnostic dans les laboratoires bactériologiques du monde entier. Pendant les cinquante dernières années on a vu surgir de nombreuses propositions ayant pour objet de remplacer ce milieu par un autre supposé meilleur, mais le résultat de ces essais n'a pas été satisfaisant. Les plus encourageants d'entre eux ont été ceux qui utilisèrent des milieux aux sels de tellure. Conradi et Troch furent les premiers à préconiser un tel milieu pour le diagnostic de la diphtérie (1912). Il ne s'est pas montré plus favorable que le sérum de bœuf coagulé; mais, depuis lors, on a multiplié les tentatives à l'effet d'obtenir un milieu aux sels de tellure qui fût électif pour le bacille diphtérique (Douglas, Pergola, Sierakowski et d'autres auteurs).

Dès le début de mes recherches sur le bacille de la diphtérie, j'ai souffert de la difficulté qu'offrait la méthode diagnostique de ce bacille qui employait le milieu de Löffler pour la culture à partir des prélèvements. Une des qualités qui fait préférer cette méthode est le bref délai dans lequel le diagnostic peut être établi : six à vingt-quatre heures. Mais ce qu'on gagne en rapidité, on le perd en certitude, le principe du diagnostic de la diphtérie étant basé sur ce fait d'observation qu'il n'y a pas dans la bouche, pendant la période de l'angine, d'autres *Corynebacterium* ayant des granulations métachromatiques et

prenant le Gram. La constatation desdits bacilles dans la culture traduit le résultat positif du diagnostic bactériologique de la diphtérie. Le diagnostic chez les porteurs est plus difficile. Chez les personnes saines on peut trouver des bacilles pseudo-diphtériques morphologiquement identiques aux bacilles diphtériques. Le diagnostic précoce à partir des prélèvements du nez ou d'autres muqueuses a une valeur encore moindre.

La séparation des bacilles diphtériques en culture pure, pour mieux observer leurs qualités, n'est pas toujours facile et elle peut être parfois impossible si l'on part de la culture mixte faite sur le milieu de Löffler au moyen d'une fausse membrane.

Je me suis alors reportée aux milieux contenant des sels de tellure, milieux qui suppriment la croissance d'autres bactéries et mettent particulièrement en évidence les colonies de bacilles diphtériques.

Un milieu qui m'a paru intéressant était la « gélose chocolat », proposée par quatre savants anglais : Anderson, Hap-pold, Mc Leod et Thomson (1), gélose à base de bouillon non chauffé au-dessus de 75° C. et stérilisé au moyen de la filtration, additionné de sang de bœuf chauffé (d'où provient sa couleur chocolat), contenant 0,04 p. 100 de tellurate de potasse (K_2TeO_3). Les colonies de bacilles diphtériques, sur ce milieu, ont un aspect caractéristique et les colonies d'autres bactéries y croissent difficilement. On peut rejeter les boîtes de Petri « négatives » sans examen microscopique. En utilisant ce milieu pour le diagnostic, les auteurs ont obtenu 8,7 p. 100 de résultats positifs en plus que sur le milieu de Löffler. En outre, ils ont constaté deux différents types de colonies, dont l'un (*Bacillus diphtheriæ gravis*) provient de cas de diphtérie graves et l'autre (*Bac. diphtheriæ mitis*) provient de cas légers. La constatation de ces types serait donc importante pour la sérothérapie, car dans les cas du *Bacillus gravis* on devrait donner de plus fortes doses de sérum.

J'ai fait sur ce milieu plus de 300 cultures, en me servant des écouvillons avec du mucus pharyngéensemencé au préalable sur le milieu de Löffler. J'ai constaté l'électivité de

(1) *Journ. Path. and Bact.*, 34, p. 667.

la « gélose chocolat ». En examinant les types de colonies, j'ai constaté que toutes les souches dont j'ai obtenu des cultures présentaient le type « gravis ». 68 de ces colonies, réensemencées sur bouillon, se sont également développées selon le type « gravis » (dépôt de petits grumeaux, voile à la surface). J'ai étudié, en plus, les propriétés hémolytiques de ces souches, au moyen de la méthode de Hammerschmidt (on mêle 1 cent. cube d'une culture sur bouillon, de quarante-huit heures, avec 1 cent. cube d'émulsion d'hématies humaines lavées; on porte à l'étuve pendant deux heures, puis à la glacière jusqu'au deuxième jour). 48 de mes souches n'ont pas provoqué l'hémolyse et 5 seulement ont faiblement hémolysé.

L'absence du type « mitis » parmi mes cultures ne doit pas surprendre, car, en général, les auteurs attribuent toujours aux bacilles diphtériques typiques le caractère « rough » (le R serait identique à « gravis »), parfois seulement ils mentionnent que, rarement, on rencontre des souches qui troublent uniformément le bouillon (« S »). La multiplicité des types S trouvés à Leeds par les auteurs anglais est plutôt surprenante.

Les données épidémiologiques témoignent cependant que le type R n'est pas l'expression d'une maladie grave : à Poznan, pendant ces dernières années (à partir de 1928) la morbidité diphtérique a augmenté, mais la mortalité est restée la même (10-20 p. 100).

Les résultats de mes cultures sur la « gélose chocolat » sont les suivants :

1° La « gélose chocolat » est un milieu dont la préparation n'est pas très difficile, mais elle doit être faite par un personnel spécialement qualifié. C'est un milieu assez cher, qui ne peut servir aux analyses courantes dans un institut qui les fait gratuitement.

2° L'aspect caractéristique des colonies du *B. diphteriae gravis* ne joue pas un rôle spécial dans nos conditions, car toutes les colonies cultivées par moi avaient les qualités du type « gravis ».

*
* *

En voulant chercher une meilleure méthode de diagnostic bactériologique de la diphtérie j'ai été obligée d'employer un

autre milieu. Dans le même temps, Clauberg perfectionnait son milieu électif pour le bacille diphtérique et il a obtenu, sur son milieu, 20 p. 100 de résultats positifs en plus que sur le sérum coagulé.

La formule du milieu de Clauberg (1) est la suivante :

On prépare :

1° Un mélange du sang de bœuf avec de l'eau 1 : 2;

2° De la gélose glycinée avec du sang selon Catani : mélange 2 parties de sang de mouton avec 1 partie de glycérine, le tout porté à la glacière. Après six à huit semaines on ajoute 5 p. 100 de ce mélange à la gélose nutritive à 3 p. 100 (ph 7,5) à la température de 45-50° C à parties égales de mélange 1 et de gélose 2 récemment préparée, on ajoute à la température de 45-50° C 4 parties pour 100 de tellurate de potasse (K^2TeO_3) dans l'eau distillée (1 p. 100). On mélange le tout et on répartit en boîtes de Petri.

Ce milieu n'est pas beaucoup plus coûteux que le sérum de bœuf coagulé. Sa préparation est moins laborieuse que celle de la « gélose chocolat » ; en outre, il est transparent.

J'ai commencé à ensemencer sur milieu de Clauberg le mucus pharyngé et nasal des écouvillons envoyés à notre Institut par les médecins, en même temps que sur le milieu de Löffler. Les premiers essais ont donné des résultats si encourageants que j'en ai fait 800. De leur côté, Tempé (2) en France, Himmelweit (3), Weigmann et Degn (4) en Allemagne, Tallo (5) en Italie, ont étudié ce milieu et l'ont trouvé bon.

Sur le milieu de Clauberg au bout de quinze à vingt-quatre heures de séjour à l'étuve des bacilles diphtériques donnent des colonies de couleur grise de 1 à 2 millimètres de diamètre. Vues à la loupe, elles ont les bords dentelés (type R). Touchées avec une anse de platine, ces colonies sont assez dures. Les colonies des bacilles pseudo-diphtériques sont souvent plus petites (à l'exception d'un type qui donne dans le même temps des colonies qui ont 3 millimètres de diamètre); elles sont

(1) *Zentralbl. Bakt. I. Orig.*, 120, p. 324.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, 104, p. 1339.

(3) *Zentralbl. Bakt. I. Orig.*, 126, p. 152.

(4) *Zentralbl. Bakt. I. Orig.*, 125, p. 374.

(5) *Giorn. Batter.*, 6.

complètement rondes, ont un aspect muqueux ; elles sont molles. Bien entendu, l'aspect des bacilles colorés, vus au microscope, est décisif, mais on peut estimer comme étant « négatives », si l'on se base seulement sur leur aspect macroscopique, les boîtes de Petri sur lesquelles rien n'a poussé, ou sur lesquelles ont poussé des colonies à peine visibles, très claires ou complètement noires. Il va de soi que l'habileté qu'on acquière en étudiant plusieurs centaines de cultures joue ici un grand rôle.

J'ai coloré les préparations de bacilles supposés diphtériques d'après deux méthodes : Gram et Neisser. Après avoir coloré environ 300 préparations d'après la méthode de Gram, je me suis convaincu que les *Corynebacterium* qui poussent en colonies grises prennent toujours le Gram ; mais j'estime que ce mode de diagnostic n'est pas nécessaire si l'on se sert du milieu de Clauberg. Il vaut mieux colorer la deuxième préparation d'après une méthode plus simple, celle de Roux ou de Löffler, qui facilite l'appréciation de la forme bactérienne.

Quant à la méthode de Neisser, je pense que nous avons surestimé la valeur diagnostique des corpuscules métachromatiques, si joliment mis en évidence au moyen de cette méthode. Sur mes 200 derniers ensemencements, 12 fois les colonies typiques ont poussé, composées de bacilles morphologiquement identiques à ceux de la diphtérie, mais dépourvues de granulations métachromatiques. Toutes ces souches ont fait fermenter les sucres selon le mode caractéristique pour les bacilles diphtériques, et 8 d'entre elles étaient virulentes pour le cobaye : c'était alors sans doute de la diphtérie, mais celle-ci n'aurait pas été reconnue si l'on avait jugé l'absence de granulations comme décisive en faveur d'un diagnostic négatif.

Les préparations, faites au moyen de cultures sur le milieu de Clauberg, doivent être colorées dix minutes avec le colorant de Neisser A B ; autrement, les granulations métachromatiques ne sont pas distinctes. La coloration rapide, suffisante pour les préparations faites à partir des cultures sur sérum coagulé, ne met pas en évidence les granulations qui appartiennent aux bacilles poussés sur le milieu de Clauberg.

Toujours à la recherche d'une méthode de diagnostic bactériologique meilleure que celle qu'on a employée jusqu'à pré-

sent, je n'ai pas voulu baser le diagnostic sur le résultat seulement présumé obtenu en vingt-quatre heures après la réception du prélèvement. Pour obtenir un diagnostic complet de bacilles diphtériques, il me paraît être important de pouvoir disposer d'une méthode aussi sûre que celle employée pour le diagnostic des bacilles typhiques. Pour arriver à ce but, il faut examiner ces bacilles diphtériques développés sur la gélose de Clauberg :

1° Par réensemencement sur gélose ordinaire (pour se rendre compte que la culture est pure et pour y observer l'aspect des colonies);

2° Par réensemencement sur les milieux liquides de His avec glucose, galactose et saccharose (pour constater les propriétés fermentatives de la souche examinée);

3° Par inoculation au cobaye pour vérifier la virulence.

L'aspect des colonies du bacille diphtérique sur gélose est caractéristique : elles sont petites, blanchâtres ou sans couleur. J'en ai examiné 160 souches et j'ai constaté qu'exceptionnellement les colonies de quelques bacilles pseudo-diphtériques peuvent avoir le même aspect. Mais le plus souvent celles-ci sont beaucoup plus grandes et de couleur blanche ou jaune parfois très prononcée.

La meilleure méthode de différenciation des bacilles diphtériques et pseudo-diphtériques est peut-être donnée par leur culture sur les milieux liquides avec les sucres. Ce mode de diagnostic ayant été étudié récemment en prenant pour base les travaux de Barrat, Bohdanowicz et Lawryniewicz, van Riemsdijk, Pesch et autres, peut être considéré comme digne de confiance. J'ai employé le milieu recommandé par les auteurs anglais : sérum de cheval, filtré sur bougie de porcelaine, dilué à 1 p. 3 avec de l'eau distillée; après chauffage à 100° C (trente minutes), on ajoute 1 p. 100 d'un sucre et 1 p. 100 de la teinture de tournesol. On stérilise dix minutes à 100° C pendant trois jours consécutifs. Je me suis servi de trois sucres : glucose, galactose et saccharose qu'on peut juger comme suffisants pour la différenciation des bacilles diphtériques et pseudo-diphtériques d'après les études des auteurs anglais. J'ai étudié, selon cette méthode, 117 souches. Les souches diphtériques ont fait fermenter le glucose et le galactose; elles n'ont pas

fait fermenter le saccharose. Les milieuxensemencés sont restés quatre jours à l'étuve.

J'ai inoculé des cobayes dans le but d'éprouver la virulence des souches, et j'ai opéré comme suit : j'ai pris une « anse normale » (diamètre 2 millimètres) directement sur la culture en gélose de Clauberg, ou sur gélose ordinaire, ou sur sérum coagulé, et je l'ai émulsionnée dans 10 cent. cubes d'eau physiologique. J'ai inoculé 0 c. c. 1 de cette dilution sous la peau de deux cobayes pesant 300 grammes environ. L'un d'eux avait été inoculé la veille avec 500 unités antitoxiques dans la cavité péritonéale et c'est lui qui servait de contrôle. Au cobaye qui n'avait pas encore reçu de sérum antidiphtérique, quatre heures après l'injection des cultures diphtériques, j'ai inoculé 100 unités de sérum antidiphtérique, ce qui n'a pas empêché la réaction cutanée, mais a prévenu la mort de l'animal due à l'action toxique des bacilles.

Comme exemple, je citerai ici les données plus précises de la dernière centaine de mes ensemencements sur le milieu de Clauberg. Toutes les souches des bacilles diphtériques obtenues par moi et provenant de cultures faites sur ce milieu ont été réensemencées sur gélose et sur les milieux sucrés, et je les ai inoculées sous la peau de cobayes. J'ai inoculé toutes les cultures, « positives » sur milieu de Löffler et « négatives » sur milieu de Clauberg, sous la peau des cobayes, en faisant le « crude test ».

Les résultats de ces recherches sont les suivants :

Sur 33 cultures, 31 se sont montrées « positives » sur le milieu de Clauberg et 22 sur le milieu de Löffler. Deux cultures, « positives » sur le milieu de Löffler et « négatives » sur le Clauberg, se sont montrées inoffensives pour le cobaye. Sur 31 cultures positives sur le Clauberg, 25 ont présenté, non seulement l'aspect des colonies caractéristique, mais aussi au microscope des bacilles typiques avec granulations métachromatiques, et cela le deuxième jour après l'ensemencement. Cinq cultures avaient l'aspect typique de colonies et la morphologie des bacilles correspondant à celle des bacilles diphtériques, mais ces bacilles étaient complètement dépourvus de granulations métachromatiques, et cela sur le milieu de Löffler comme sur le milieu de Clauberg. Néanmoins, j'ai réensemencé

ces bacilles sur gélose ordinaire et dans les milieux sucrés, et j'ai constaté l'aspect des colonies sur la gélose caractéristique pour les bacilles diphtériques et la fermentation caractéristique des sucres sur les milieux de His. Quatre de ces souches se montrèrent virulentes pour le cobaye.

D'une manière générale, la moitié des souches diphtériques que j'ai séparées se sont montrées virulentes pour les cobayes, inoculées selon le mode décrit plus haut. Ce résultat est plutôt accidentel, car dans la centaine d'ensemencements précédents 18 souches étaient virulentes et 7 avirulentes. On peut supposer qu'à doses plus grandes quelques-unes des souches « avirulentes » se seraient montrées pathogènes. J'espère encore élucider cette question dans un travail prochain.

RÉSUMÉ.

Sur la « gélose chocolat » d'Anderson, Happold, McLeod et Thomson, j'ai fait plus de 300 ensemencements d'exsudats de la gorge et du nez, envoyés à l'Institut de Microbiologie médicale dans le but d'établir le diagnostic bactériologique de la diphtérie. J'ai constaté que la préparation de ce milieu est assez difficile; son coût est assez élevé en comparaison du milieu de Löffler, et dans les conditions actuelles de notre ville de Poznan je n'ai trouvé que des souches « malignes »; en conséquence, je ne pouvais pas étudier la question de l'action biologique différente des deux types de bacilles diphtériques.

J'ai fait les 800 ensemencements suivants sur la gélose avec du tellurate de potasse (K_2TeO_4), préconisé par Clauberg. Ce milieu est peu coûteux; sa préparation est assez facile et il est transparent. Les colonies de bacilles diphtériques ont un aspect caractéristique et le développement des autres microbes est arrêté. On a pu considérer la moitié des résultats comme « négatifs », dispensant de faire des préparations microscopiques et de les étudier. J'ai cultivé 117 souches sur les milieux avec des sucres. J'ai fait 75 inoculations intradermiques de cobayes pour déterminer la virulence des souches des bacilles diphtériques. Les résultats positifs étaient un quart plus nombreux sur le milieu de Clauberg que sur le milieu de Löffler. J'ai pu augmenter le nombre des résultats positifs encore d'un quart,

en prenant en considération les bacilles diphtériques dépourvus de granulations métachromatiques.

CONCLUSIONS.

Le milieu d'Anderson, Happold, McLeod et Thomson n'a pas d'utilisation pratique pour le diagnostic bactériologique de la diphtérie dans les instituts qui exécutent obligatoirement ces analyses, mais on peut avantageusement remplacer le milieu de Löffler par le milieu de Clauberg.

En effectuant les analyses microscopiques, il faut tenir compte des bacilles diphtériques dépourvus de granulations métachromatiques, ce qui augmente sensiblement le nombre des résultats positifs.

Actuellement, à l'Institut de Microbiologie médicale de l'Université de Poznan, on ensemeince seulement sur le milieu de Clauberg les prélèvements envoyés en vue du diagnostic bactériologique de la diphtérie.

RECHERCHES SUR LA CONSTITUTION DU LACCOL [1]

par MM. GABRIEL BERTRAND et GEORGES BROOKS.

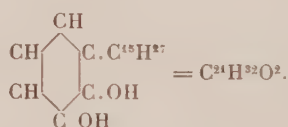
Les précieux objets de laque et les beaux objets laqués de l'Extrême-Orient sont obtenus avec des latex récoltés en incisant le tronc de divers arbres de l'ordre des Anacardiacees, principalement : en Chine et au Japon de *Rhus vernicifera* D. C., en Indochine de *Rhus succedanea* L. fils, au Cambodge de *Melanorrhœa usitata* Wall.

La composition chimique du latex de *Rhus vernicifera* a été étudiée la première. En 1882, S. Ishimatsu a séparé de cette sécrétion végétale près de 60 p. 100 d'une substance oléagineuse soluble dans l'alcool, 6 1/2 p. 100 de gomme et 33 1/2 p. 100 d'eau. A la substance soluble dans l'alcool et précipitable par l'acétate de plomb, il a donné, d'après l'analyse du composé plombique, la formule brute $C^{20}H^{30}O^2$ [2]. Cette étude a été reprise l'année suivante par H. Yoshida et par O. Korschelt. Selon ces deux chimistes, la substance principale du latex serait de caractère acide et de formule $C^{14}H^{18}O^2$. Yoshida l'a appelée acide urushique [3] ; il a observé, en outre, que la transformation du latex était sous la dépendance d'une diastase [4].

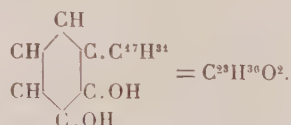
Le latex de *Rhus succedanea* a été examiné un peu plus tard. En 1894, l'un de nous, opérant sur le produit de l'arbre à laque du Tonkin, lui a trouvé une composition très voisine de celui du Japon, mais a reconnu que le liquide oléagineux était un polyphénol et non un acide, d'où le nom de *laccol* qu'il lui a donné. Quant à la diastase, il a réussi à démontrer qu'elle appartenait à un nouveau type de catalyseurs biologiques, celui des oxydases, et il l'a appelée laccase. Obligé de surseoir à l'étude du laccol, dont il ne pouvait supporter que péniblement les propriétés irritantes, il a du moins mis en évidence, par diverses recherches, que les hydroxyles phénoliques du laccol étaient en situation ortho ou para et que la transformation du latex en laque correspondait à la production d'une sorte de quinone, probablement même d'une quinone condensée [5].

Pour définir d'une manière plus complète le mécanisme de formation des laques d'Extrême-Orient et faciliter l'étude des problèmes qui s'y rattachent, il était nécessaire de connaître plus exactement la constitution de l'acide urushique et celle du laccol.

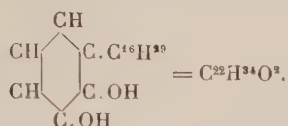
R. Majima, seul ou avec des collaborateurs, a publié à ce sujet, de 1907 à 1922, une longue et très intéressante série de recherches [6]. Majima a surtout étudié le principal constituant de l'urushi. Il a constaté, tout d'abord, que c'était, comme dans le cas de l'arbre à laque du Tonkin, non pas un acide, mais un polyphénol : l'acide urushique est devenu ainsi l'urushiol. Il y a dans ce corps deux hydroxyles phénoliques situés en position ortho et une longue chaîne latérale d'hydrocarbure non saturée. Majima suppose l'existence dans cette chaîne de deux liaisons éthyléniques dont les places sont encore à déterminer. Après avoir hésité entre une chaîne en C^{15} et une chaîne en C^{16} , il a proposé finalement de représenter l'urushiol par la formule suivante :



Le même savant a examiné aussi, mais d'une manière moins approfondie, un échantillon de latex d'Indochine. D'après lui, le laccol qui s'y trouve serait un homologue supérieur de l'urushiol avec la formule de constitution :



Des circonstances nous ayant permis de reprendre l'étude du laccol, nous avons obtenu des résultats qui ne concordaient pas entièrement avec la formule proposée par Majima [7]. D'après nos expériences, le laccol, que nous sommes parvenus à obtenir pour la première fois à l'état cristallisé, ne renfermerait qu'une chaîne latérale à 16 atomes de carbone et aurait ainsi pour formule :



Cette conclusion repose sur les propriétés et l'analyse de divers composés et, particulièrement, de dérivés relativement simples du laccol, d'une bonne stabilité, aisément cristallisables, et pouvant être amenés à l'état de pureté complète : ces composés sont les esters diacétique et dipropionique du tétrahydro-laccol.

Sans nous étendre ici sur toutes les expériences que nous avons faites, nous décrirons la préparation, l'analyse et les propriétés des corps qui nous ont conduits à la conclusion ci-dessus formulée.

LE LACCOL.

Pour obtenir ce principe caractéristique de l'arbre à laque du Tonkin, on traite d'abord le latex par l'alcool fort, ainsi qu'il a été décrit autrefois par l'un de nous [8]; on reprend l'extrait alcoolique par l'eau et l'éther; on distille la solution éthérée et l'on obtient le laccol brut, dans la proportion de 75 à 85 p. 100 du poids du latex, suivant les échantillons.

Il y a dans ce produit, non seulement du laccol, mais plusieurs substances assez difficilement séparables, dont une, au moins, renferme de l'azote [9]. La purification par dissolution fractionnée dans des solvants neutres ou par précipitation progressive à l'aide de l'acétate de plomb est fortement gênée par la facilité avec laquelle le laccol s'oxyde au contact de l'oxygène atmosphérique, déjà à la température ordinaire. Le moyen qui nous a le mieux réussi est la distillation fractionnée sous une pression extrêmement réduite.

Quand on essaye de distiller le laccol brut dans le vide de la trompe à eau et même sous la pression réduite à 1 ou 2 millimètres avec une bonne pompe ordinaire de laboratoire, on assiste à une décomposition profonde, un véritable cracking, rappelant tout à fait celui qui a été décrit par R. Majima et S. Chô à propos de l'urushiol [10] : il se dégage un mélange de gaz et de vapeurs, parmi lesquels des carbures saturés et non saturés, une petite quantité de pyrocatéchol aisément condensable à l'état

cristallisé 41, du laccol de coloration jaune d'or, et il reste une proportion importante de liquide brun difficilement distillable, qui se prend en masse amorphe par refroidissement. Cette décomposition devient de moins en moins sensible au fur et à mesure des redistillations successives, de sorte que l'on finit par obtenir un laccol passant avec une faible décomposition seulement entre $+ 280$ et $+ 290^{\circ}$ sous la pression de 10 à 15 millimètres. Le rendement atteint environ 30 p. 100 du poids du laccol brut. C'est alors un liquide oléagineux, de coloration jaune pâle, brunissant assez rapidement au contact de l'air. Le froid augmente sa viscosité et y fait apparaître une certaine quantité de cristaux, suffisante pour donner à la masse une consistance pâteuse, mais insuffisante pour en permettre pratiquement l'extraction.

Les résultats sont beaucoup meilleurs lorsqu'on distille le laccol brut sous pression très réduite, ne dépassant pas 1/20 de millimètre. Il n'y a pour ainsi dire plus alors de cracking, la distillation se fait régulièrement, on peut utiliser avec avantage un séparateur 12, et l'on obtient, après deux à trois passages, un cœur de distillation passant vers $+ 220^{\circ}$ 13, et atteignant jusqu'aux 2/3 du poids du laccol brut.

Ce laccol est aussi un liquide, légèrement teinté de jaune, parfois même incolore au moment de sa condensation, mais qui jaunit, puis brunit assez rapidement à l'air. Sa densité à $+ 22^{\circ}$ a été trouvée égale à 0,9963 et son indice de réfraction, pris sur 1 goutte avec l'appareil d'Abbe, de 1,5046 à la température de $+ 20^{\circ}$.

Placé dans une armoire refroidie vers $+ 5^{\circ}$, il n'a pas tardé à se prendre en une masse solide, blanche, entièrement cristallisée, fusible seulement à $+ 23^{\circ}$. Pour déterminer ce point de fusion, nous avons enfermé du laccol fraîchement distillé, par portions d'une dizaine de grammes, dans des tubes de verre que nous avons scellés sous vide, et nous avons plongé ces tubes dans des bains d'eau maintenus à des températures variées; les cristaux, entièrement fusibles à $+ 23^{\circ}$, se reformaient déjà, quoique lentement, et devenaient alors très nets, par un abaissement de 1° et même de $1/2^{\circ}$. Dans ce cas, ils affectaient la forme de lamelles allongées et réunies en groupes sphériques, facilement reconnaissables.

DIACÉTYLLACCOL.

On a chauffé quelques heures à l'ébullition un mélange de laccol (20 grammes) et d'anhydride acétique pur en excès (200 grammes), on a chassé par distillation le réactif non employé et dilué le résidu dans de l'éther. La solution étherée a été lavée avec du carbonate de sodium au 1/10, puis évaporée dans le vide au bain-marie pour chasser l'éther. Le produit brut, séché dans le vide sur de la chaux vive, a été soumis à la distillation sous pression réduite. Il a passé, entre $+ 240^{\circ}$ et $+ 250^{\circ}$, à la pression de 0 mm. 5 et à la vitesse de 1 à 11 gouttes par seconde, un liquide faiblement teinté de jaune citron non colorable en solution alcoolique par le perchlorure de fer, entièrement formé de diacétyllaccol. Le poids obtenu représentait 95 p. 100 du rendement théorique.

Densité à $+ 22^{\circ}$: 0,9774.

Indice de réfraction : sur 1 goutte, avec l'appareil d'Abbe, à la température de $+ 22^{\circ}$: 1,4761.

Dosage de groupes acétyles (par la méthode décrite plus loin au sujet de l'acétylhydrolaccol) :

| SUBSTANCE analysée | NaOH/10 employé en cent. cubes | ACIDE ACÉTIQUE trouvé p. 100 |
|-----------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| 0,2996 | 14,4 | 28,83 |
| 0,2820 | 13,6 | 28,93 |

Le calcul indique 28,98 p. 100 pour la formule $C^{22}H^{32}(O.CO.CH^3)^2$.

LE TÉTRAHYDROLACCOL.

Préparation. — Le laccol est aisément transformé en tétrahydrolaccol par fixation d'hydrogène gazeux, à la température ordinaire, sous l'influence de noir de platine. Voici comment nous avons réalisé cette transformation.

Dans le flacon à réaction L de l'appareil représenté page 768 on introduit, par la tubulure A, 1 gr. 5 de noir de platine préparé exactement suivant la méthode de O. Loew [14]; on verse 25 grammes de laccol fondu qui s'étend à la surface du noir de

platine, puis on ajoute 50 cent. cubes d'alcool absolu. Si l'on introduisait le noir de platine dans la solution alcoolique de laccol, il pourrait y avoir inflammation du mélange de vapeur d'alcool et d'air à l'intérieur du flacon. La tubulure A est alors munie de son bouchon et de son robinet, on fait passer, arrivant en R, un fort courant d'hydrogène, et, lorsque l'air du flacon à réaction est complètement chassé, on ferme le robinet terminal, placé en A (fig. 1).

Par une manœuvre des robinets R, R¹ et R² ainsi que de la

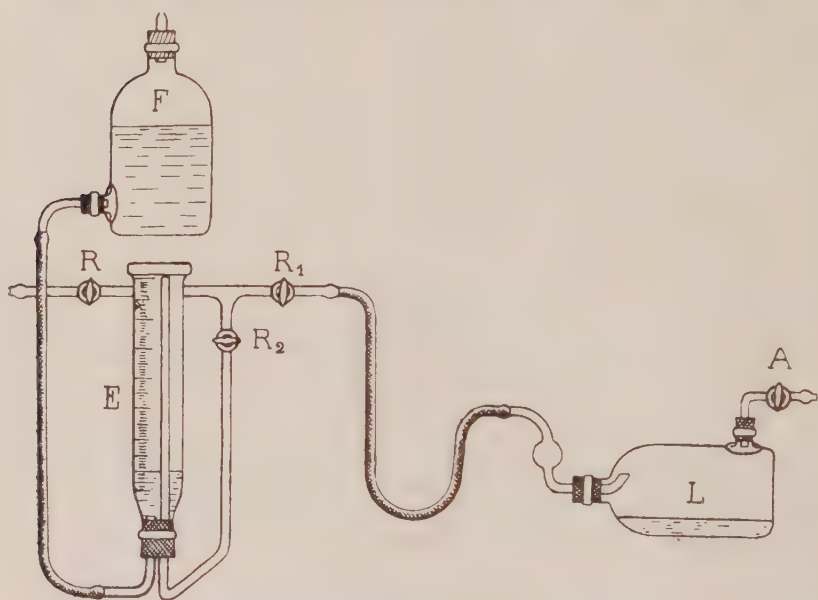


FIG. 1.

fontaine F qui peut être abaissée et remontée à volonté, on remplit l'éprouvette graduée avec de l'hydrogène, puis on ferme le robinet d'arrivée R. En établissant la concordance des niveaux de l'eau en F et en E avant de fermer les robinets d'arrivée de l'hydrogène, on a le moyen de mesurer le volume du gaz renfermé dans l'éprouvette, à la pression et à la température du laboratoire. On met en marche la machine à secouer, non représentée sur la figure, dans le berceau de laquelle repose le flacon à réaction.

L'absorption de l'hydrogène commence aussitôt et l'eau de la

fontaine monte dans l'éprouvette. Lorsque celle-ci est vide d'hydrogène, on la remplit par une nouvelle manœuvre, et ainsi de suite, jusqu'à ce que le niveau de l'eau dans l'éprouvette cesse de monter par agitation du flacon L. Au début, l'absorption de l'hydrogène est très rapide et le mélange en réaction s'échauffe, elle se ralentit ensuite de plus en plus, de sorte qu'il faut beaucoup plus de temps pour fixer la seconde moitié du gaz que la première.

Voici, à titre d'exemple, la marche d'une opération :

| VOLUMES D'H absorbés en cent. cubes [15] | TEMPS COMPTÉS à partir du début en minutes | TEMPS pour absorber 500 cent. cubes en minutes |
|--|---|---|
| 500. | 3 | 3 |
| 1.000. | 7 | 4 |
| 1.500. | 22 | 15 |
| 2.000. | 42 | 20 |
| 2.500. | 75 | 33 |
| 3.000. | 123 | 48 |
| 3.500. | 195 | 72 |

Après environ trois heures d'agitation, l'hydrogène n'étant plus absorbé d'une manière appréciable, la solution alcoolique a été filtrée pour séparer le platine [46]; elle a fourni, par distillation au bain-marie, sous pression réduite, un résidu moins coloré que le laccol primitif, qui s'est solidifié par simple refroidissement.

Purification. — Nous avons d'abord essayé de purifier l'hydrolaccol brut, obtenu dans l'opération précédente, en le faisant cristalliser à plusieurs reprises dans le benzène et en pressant chaque fois les cristaux entre des lits de papier à filtre; mais ce procédé occasionnant de fortes pertes, nous avons recouru à la distillation fractionnée dans le vide de la trompe à eau.

Après douze distillations effectuées dans un ballon de Ladenburg à deux boules, nous avons recueilli une substance à peu près pure, passant entre $+ 265$ et $+ 275^{\circ}$ sous une pression de 8 à 10 millimètres [47].

Propriétés. — L'hydrolaccol ainsi purifié est facilement soluble à froid dans l'alcool à 95° , l'éther, l'acétone, le benzène, le chloroforme, l'éther de pétrole et l'acide acétique. En le cristallisant dans le xylène, on l'obtient en aiguilles très fines, fusibles

à $+62^{\circ}$ - 63° (corrigé) en tube capillaire. Majima et Chiba avaient trouvé pour la même substance : $+63^{\circ}$ - 64° .

La densité à la température de $+64^{\circ}$ est de 0,9125.

En solution alcoolique, l'hydrolaccol présente les mêmes réactions colorées que le laccol. Il devient vert par le chlorure ferrique 1 p. 4.000 ; si on ajoute alors quelques gouttes de bicarbonate de sodium à 10 p. 100 la coloration devient rose ; avec la soude elle devient rouge violacée. En employant le réactif Denigès, la zone de séparation est rouge, surmontée d'un anneau verdâtre. Avec l'acétate de plomb, on a un précipité blanc. La solution ammoniacale de NO^+Ag est réduite ainsi que la liqueur cuproalcaline. En solution acétique, le brome est absorbé. Ces réactions montrent que les deux oxhydrides phénoliques n'ont pas été touchés par l'hydrogénation.

Analyse élémentaire. — La combustion a donné les résultats suivants :

| SUBSTANCE en gr. | CO^2 | H^2O | C p. 100 | H p. 100 |
|---|---------------|----------------------|-------------|-------------|
| 0,2744 | 0,7954 | 0,2753 | 78,92 | 11,40 |
| 0,2547 | 0,7360 | 0,2593 | 78,79 | 11,37 |
| 0,2806 | 0,8144 | 0,2875 | 79,05 | 11,42 |
| 0,2747 | 0,7927 | 0,2826 | 78,83 | 11,50 |
| 0,2499 | 0,7246 | 0,2590 | 79,07 | 11,59 |
| Calculé pour $\text{C}^{22}\text{H}^{28}\text{O}^2$ | | | 79,04 | 11,38 |

Poids moléculaire. — La détermination du poids moléculaire de l'hydrolaccol a été faite par cryoscopie dans du phénol. Le dépressimètre d'Eykman a donné dans ce cas des résultats excellents.

Voici les chiffres obtenus avec les corps servant de comparaison et ceux donnés par l'hydrolaccol, en prenant 72 comme constante de congélation du dissolvant :

| CORPS | POIDS de substance en gr. | POIDS de phénol | ABAISSEMENT en degrés | POIDS MOLÉCULAIRE | |
|---------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|---------|
| | | | | Trouvé | Calculé |
| Naphtaline | 0,256 | 13,7210 | 1,016 | 132 | 128 |
| Gaiacol | 0,1228 | 13,2905 | 0,537 | 124 | 124 |
| Hydrolaccol | 0,3123 | 14,0457 | 0,478 | 335 | 334 |
| Hydrolaccol | 0,1361 | 12,8068 | 0,230 | 332 | |
| Hydrolaccol | 0,4060 | 11,9419 | 0,730 | 335 | |

La composition centésimale et le poids moléculaire correspondent bien à la formule $\text{C}^{22}\text{H}^{28}\text{O}^2$ d'un tétrahydrolaccol.

TÉTRAHYDROLACCOLATE DE PLOMB.

Nous avons préparé ce composé en ajoutant à 0 gr. 7 d'hydrolacol dissous dans 20 cent. cubes d'alcool à 95° 1 gr. 4 d'acétate de plomb dissous dans un peu d'eau. Le précipité blanc a été recueilli sur un filtre, lavé à l'alcool à 90° et séché dans le vide sulfurique. Il a donné à l'analyse, le plomb étant dosé à l'état de sulfate par chauffage direct de la substance avec un excès d'acide sulfurique :

| SUBSTANCE | POIDS de Pb | TROUVÉ p. 100 |
|--|----------------|------------------|
| — | — | — |
| 0,157. | 0,0397 | 38,08 |
| 0,470. | 0,2622 | 38,11 |
| Calculé pour $C^{22}H^{36}O^2Pb$ | | 38,39 |

DIACÉTYL-TÉTRAHYDROLACCOL.

Préparation. — On chauffe doucement dans un ballon de 150 centimètres, muni d'un réfrigérant ascendant à air, 6 grammes d'hydrolacol pur et 60 grammes d'anhydride acétique fraîchement distillé. L'addition de chlorure de zinc n'est pas nécessaire. La réaction se manifeste immédiatement et la solution colorée commence à s'éclaircir. On maintient à l'ébullition pendant dix heures. Puis, après avoir laissé refroidir, on précipite le dérivé diacétylé dans un excès d'eau froide, on l'essore, on le lave avec l'eau contenant du carbonate de sodium pour enlever l'excès d'anhydride acétique et on termine le lavage à l'eau distillée. Le produit brut est placé pendant quelques jours dans le vide, sur de la chaux vive, pour éliminer toute trace d'anhydride et d'acide libre. On le fond ensuite avec un peu d'alcool méthylique, on laisse refroidir complètement et on passe la masse solide à la presse entre deux lits de papier à filtre. On obtient ainsi des cristaux blancs en paillettes. Le rendement est presque théorique.

Purification. — Avant l'analyse, ces cristaux ont été purifiés d'une manière définitive par fractionnement avec de l'alcool méthylique à 98 p. 100 jusqu'à solubilité constante.

Pour cela, 2 grammes de substance ont été agités dans un fla-

con avec 20 cent. cubes d'alcool méthylique, pendant vingt-quatre heures, à l'aide d'une roue hydraulique, à la température du laboratoire. La solution saturée a été décantée après repos, et sa concentration déterminée par évaporation d'une partie aliquote. La partie non dissoute a été additionnée de 20 cent. cubes d'alcool méthylique et soumise de nouveau à l'agitation. Cette opération a été répétée jusqu'à solubilité constante (tableau I).

TABLEAU I.

| FRACTIONNEMENTS | TEMPÉRATURE en degrés | SOLUBILITÉ p. 100 | POINTS DE FUSION en degrés |
|-----------------|--------------------------|----------------------|-------------------------------|
| I | 21 | 0,428 | + 52 |
| II | 21 | 0,320 | + 56 |
| III | 21 | 0,326 | + 56 |
| IV | 19 | 0,240 | + 58,7 |
| V | 19 | 0,240 | + 58,7 |
| VI | 18 | 0,240 | + 58,7 |

Propriétés. — Les portions alcooliques dont la concentration était égale ont été jointes au résidu et, après avoir recristallisé dans l'alcool méthylique à chaud, on a obtenu un corps pur, fondant à + 58°7 (corrigé).

Le dérivé diacétylé ainsi obtenu est soluble dans l'alcool, l'éther, le benzène, l'acétone, l'éther acétique, le chloroforme, etc. En solution acétique, il ne décolore pas le brome, et en solution dans l'alcool il ne colore pas le chlorure ferrique.

Dosage des groupes acétyles. — Le dosage des groupes acétyles est basé sur une saponification au moyen de l'acide sulfurique dilué [18] mettant en liberté le reste acétique et sur un titrage volumétrique de l'acide volatil. La formation possible d'acide sulfureux gênerait le dosage. Pour éviter des déterminations erronées, on ajoute 1 goutte de solution concentrée de sulfate ferrique et l'on s'arrange de façon à éviter la concentration de l'acide sulfurique dans lequel le produit est dissous. Détails importants dans ce genre d'opération.

Technique. — On se sert de l'appareil de G. Bertrand pour le dosage des acides volatils [19] (fig. 2).

La substance est pesée dans un très petit tube à essai que l'on introduit dans le ballon D à l'aide d'un fil de fer fixé au

tube plongeant par un anneau en caoutchouc. Ce dispositif commode évite toute perte de produit. On adapte le ballon au réfrigérant, puis on le met en relation avec un ballon B, d'environ 1 litre de capacité, contenant de l'eau que l'on porte à l'ébullition. Le courant de vapeur barbotte dans la solution sulfurique et entraîne l'acide acétique. On évite tout entraînement mécanique du liquide grâce aux deux ampoules *a* et *b* dont est muni le tube qui plonge dans le ballon D. Il est indis-

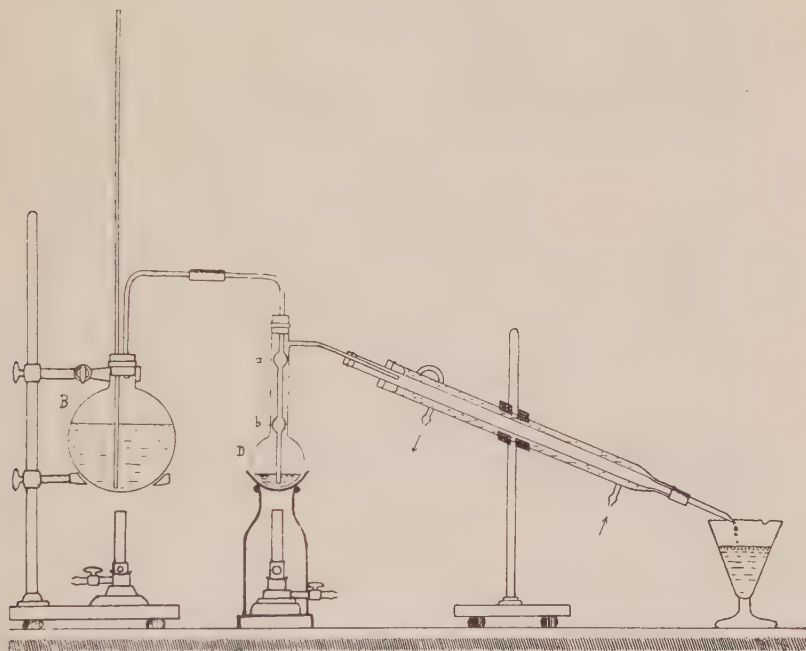


FIG. 2.

pensable de chauffer celui-ci au moyen d'une petite flamme de manière à ce que le volume primitif n'augmente pas par la condensation de la vapeur d'eau. Si on néglige cette précaution, l'acide acétique se dilue beaucoup dans le ballon D et l'entraînement devient interminable. Il ne faut pas non plus chauffer trop pour éviter la concentration de l'acide sulfurique et la carbonisation de la matière organique.

En opérant soigneusement, le dosage peut être terminé en vingt à trente minutes. L'acide acétique libéré est recueilli

dans un verre à pied et on titre le distillat au fur et à mesure, en présence de I ou II gouttes de phtaléine du phénol, avec de la soude décarbonatée N/10.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

1° Par comparaison avec le diacétyl-pyrocatéchol :

| SUBSTANCE en gr. | NaOH N/10 en cent. cubes | ACIDE acétique p. 100 |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| 0,350. | 35,4 | 61,54 |
| Calculé pour $C^6H^4(OCOCH^3)^2$ | | 61,85 |

2° Avec le diacétyl-tétrahydrolaccol :

| SUBSTANCE en gr. | NaOH N/10 en cent. cubes | ACIDE acétique p. 100 |
|--|-----------------------------|-----------------------------|
| 0,3410 | 16,0 | 28,15 |
| 0,2575 | 12,3 | 28,66 |
| 0,5140 | 24,4 | 28,48 |
| Calculé pour le diacétyl-tétrahydrolaccol $C^{22}H^{36}(OCOC^2H)^2$ | | 28,70 |
| Calculé pour le monoacétyl-tétrahydro- laccol $C^{22}H^{37}(OH)(OCOCH^3)$ | | 15,95 |

Analyse élémentaire. — Le diacétyl-tétrahydrolaccol a donné les chiffres suivants :

| SUBSTANCE en gr. | COMBUSTION | |
|--|-------------------|---------------------|
| | Carbone p. 100 | Hydrogène p. 100 |
| 0,2087. | 74,20 | 10,60 |
| 0,3101. | 74,02 | 10,32 |
| 0,2219. | 73,99 | 10,23 |
| 0,4511. | 74,26 | 10,22 |
| Calculé pour $C^{22}H^{36}(OCOCH^3)^2$ | 74,64 | 10,05 |

Poids moléculaire. — La détermination du poids moléculaire a été faite dans le phénol :

| SUBSTANCE en gr. | POIDS du phénol | ABAISSEMENT en degrés | P. M. trouvé |
|--|--------------------|--------------------------|-----------------|
| 0,3218 | 12,6367 | 0,440 | 426 |
| 0,3456 | 14,8636 | 0,405 | 413 |
| 0,5422 | 12,2480 | 0,770 | 414 |
| Calculé pour $C^{22}H^{36}(OCOCH^3)^2$ | | | 418 |

DIPROPIONYL-TÉTRAHYDROLACCOL.

Préparation. — Pour obtenir le composé on chauffe pendant deux heures au réfrigérant ascendant un mélange de 10 grammes d'hydrolaccol et de 6 gr. 5 de chlorure de propionyle fraîchement distillé; on élimine l'excès de chlorure par distillation. Le résidu est repris par de l'alcool butylique à chaud. Après avoir débarrassé les cristaux de presque toutes les impuretés en les pressant entre deux couches de papier à filtre, on continue à les purifier par une série de cristallisations dans l'alcool absolu jusqu'au point de fusion constant. Ils se présentent sous la forme de paillettes incolores, légères et brillantes.

Rendement en substance pure : 3 gr. 5.

Propriétés. — Le dérivé dipropionylé ainsi obtenu est fusible à $+34^{\circ}8$ (corrigé) en tube capillaire. Il ne donne pas de coloration avec le chlorure ferrique, sa fonction phénolique est donc entièrement bloquée par les restes d'acides.

Le dipropionyl-tétrahydrolaccol est très soluble dans l'alcool, l'éther, le benzène, le chloroforme, l'acétone.

Analyse. — Traité dans les mêmes conditions que le dérivé acétylé, il a donné, en acide propionique :

| SUBSTANCE en gr. | NaOH N/10 en cent. cubes | ACIDE propionique p. 100 |
|--|-----------------------------|--------------------------------|
| 0,323, | 14,5 | 33,21 |
| 0,484. | 21,7 | 33,17 |
| Calculé pour $C^{22}H^{36}(OCOCH^2CH^3)^2$ | | 33,15 |

Cryoscopie. — La détermination du poids moléculaire a été faite, cette fois encore, dans le phénol, avec l'appareil d'Eykman :

| SUBSTANCE en gr. | PHÉNOL | ABAISSEMENT en degrés | P. M. trouvé |
|--|--------|--------------------------|-----------------|
| 0,302 | 13,627 | 0,357 | 447 |
| 0,453 | 13,428 | 0,549 | 443 |
| Calculé pour $C^{22}H^{36}(OCOCH^2$ $CH^3)^2$ | | | 446 |

CONCLUSIONS.

L'ensemble des faits observés et des résultats quantitatifs obtenus au cours des recherches que nous venons d'exposer démontrent que le laccol extrait du latex de l'arbre à laque du Tonkin possède la formule :



et s'apparente, par conséquent, à la fois à deux principes immédiats très répandus dans les organismes vivants : au pyrocatechol, par son noyau cyclique, et à l'acide palmitique, par sa longue chaîne latérale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ce mémoire est le développement d'une note publiée l'année dernière dans les *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, **195**, séance du 8 août, p. 405.
- [2] *Mem. of Manchester literary and philosophical Soc.*, 7^e série, **3**, 1882, p. 249.
- [3] Du nom *urushi* du latex de l'arbre à laque au Japon.
- [4] YOSHIDA (H.). *Journ. chem. Soc.*, **43**, 1883, p. 472; YOSHIDA (H.) et KORSCHULT (O.), *Trans. As. Soc. Japan*, **12**, 1883, p. 182.
- [5] BERTRAND (Gab.). *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, **118**, 1894, p. 1215; **120**, 1895, p. 266; **122**, 1896, p. 1132; **137**, 1903, p. 1269; *Ann. Chim. Phys.*, 7^e série, **12**, 1897, p. 115, etc.
- [6] Dans les *Ber. d. chem. Ges.* et rassemblées dans *Untersuchungen über den Japanlack*, Tokyo, 1924.
- [7] Cette discordance est explicable par les difficultés du problème à résoudre; le laccol est, pour la plupart des personnes, très pénible à manier; il s'oxyde assez rapidement dès la température ordinaire, supporte mal l'action de la chaleur et ne présente qu'un petit nombre de caractères permettant de le séparer des substances qui l'accompagnent; enfin, la grandeur de sa molécule atténue sensiblement la valeur des résultats de l'analyse élémentaire.
- [8] BERTRAND (Gab.). *Bull. Soc. Chim.*, 2^e série, **2**, 1894, p. 717.
- [9] TSCHIRCH (A.) et STEVENS (A. B.) ont signalé, en 1905, la présence de l'azote dans le résidu oléagineux extrait du latex par l'alcool; ils ont remarqué aussi qu'une partie de ce résidu était peu soluble dans l'éther de pétrole. *Arch. d. Pharm.*, **243**, 1905, p. 504.
- [10] MAJIMA (R.) et CHÔ (S.). *Ber. d. chem. Ges.*, **40**, 1907, p. 4390 et *Journ. of College Sci. Imp. Univ.*, Tokyo, **25**, 1908.
- [11] Fusible à +104°5 au bloc Maquenne, après purification dans le benzène.
- [12] Nous nous sommes servis de l'appareil décrit par G. Bertrand dans *Bull. Soc. Chim.*, 3^e série, **29**, 1903, p. 778.

- [13] A cause du point d'ébullition élevé du liquide et de la forte densité de la vapeur, cette température varie sensiblement avec la forme et les dimensions du ballon distillatoire; elle varie naturellement avec la vitesse de distillation.
- [14] LOSW (O.). *Ber. d. chem. Ges.*, **23**, 1890, p. 289. Il faut apporter le plus grand soin à la préparation de ce catalyseur, car de faibles modifications dans la conduite de l'opération peuvent en réduire l'activité. Nous indiquerons à cause de cela, avec quelques détails, le mode opératoire dont nous nous sommes servis. On attaque le platine par un mélange de quatre parties de HCl de $d=1,19$ et d'une partie de NO_3H de $d=1,33$. On chauffe doucement jusqu'à dissolution complète du métal. On évapore alors à siccité et, à deux reprises, on traite le résidu par HCl en évaporant chaque fois à sec. Ce traitement a pour but d'éliminer les composés nitrés dont la présence est nuisible. On dissout 10 grammes de chlorure de platine ainsi obtenu dans 12 cent. cubes d'eau (sans s'inquiéter d'un peu de chlorure platinéux insoluble, provenant de l'évaporation à sec et dont la présence ne gêne pas le reste de l'opération). On ajoute 14 cent. cubes d'aldéhyde formique à 40-50 p. 100. Le liquide est refroidi dans la glace. On verse alors goutte à goutte une solution de 10 grammes de soude caustique dans 15 cent. cubes d'eau, en ayant soin d'agiter constamment et d'éviter toute élévation de température. Cette addition exige une heure et demie; le mélange est alors abandonné jusqu'au lendemain. On filtre à la trompe; le filtrat est légèrement jaunâtre et contient un peu de chlorure de platine non réduit que l'on peut récupérer en chauffant la solution au bain marie. La filtration terminée, on lave le platine; mais bientôt, ce métal finement divisé commence à absorber l'oxygène d'une façon assez vive; la température s'élève vers 50° et, avec de petits crépitements, cette boue se transforme en une masse poreuse et légère. Après un repos de plusieurs heures, on recommence le lavage jusqu'à ce que le liquide filtré ne donne plus aucun louche avec le nitrate d'argent. Cette dernière précaution est très importante. Le noir, bien lavé, est mis à sécher dans le vide sulfurique et peut être employé dès le lendemain.
- [15] A la pression de 740 milligrammes et à la température de $+20$.
- [16] Ce platine doit être lavé, séché et calciné, puis transformé en chlorure et précipité de nouveau par le formol et la soude, car il a perdu la plus grande partie de son activité.
- [17] Même observation que pour le laccol au sujet de la température de distillation.
- [18] 2 cent. cubes d'acide sulfurique et 1 cent. cube d'eau.
- [19] Décrit par BERTRAND (Gab.) et THOMAS (P.). *Guide pour les manipulations de Chimie biologique*, 3^e édition, Paris, 1919, p. 153, Dunod et Pinat, éditeurs.

LA RAGE AUTOCHTONE (MALADIE DU CHIEN FOU) EN AFRIQUE OCCIDENTALE FRANÇAISE (ÉTUDE CRITIQUE ET EXPÉRIMENTALE),

par S. NICOLAU, C. MATHIS et M^{me} Val. CONSTANTINESCO.

Jusqu'à une époque récente, l'existence de la rage a été niée en Afrique occidentale française. Mais, si la rage classique était considérée comme non existante, par contre, les indigènes ont connu de tout temps une maladie spéciale du chien, appelée en dialecte bambara *Oulou-fato*, c'est-à-dire maladie du chien fou, ressemblant à la rage canine, mais présentant le caractère tout à fait particulier de ne pas être transmissible à l'homme. Cette croyance de la non-transmissibilité à l'homme, universellement répandue parmi les indigènes et partagée par nombre d'Européens, semble appuyée par le fait que les documents du Service de Santé, jusqu'à ces dernières années, n'ont jamais mentionné des cas de rage humaine.

Le premier cas de rage humaine, connu mais non publié, est celui qui, d'après Heckenroth (1), a été rapporté par Cavasse (2). Il s'agit d'un garde de cercle indigène, évacué du village de Kadé à 400 kilomètres de la côte, sur l'hôpital de Conakry. Selon toute vraisemblance, cet homme aurait été mordu par un chien indigène n'ayant pas été en contact avec des chiens importés d'Europe. Ce serait donc un cas mortel imputable au virus autochtone africain, au virus du chien fou.

En ce qui concerne la rage canine, son existence au Sénégal a été démontrée expérimentalement pour la première fois par Teppaz (3), en 1910. Mais, l'auteur n'ayant pas indiqué s'il s'agissait d'un chien fou ou d'un animal mordu par un chien d'Europe atteint de rage classique, on ne sait s'il a eu affaire à

(1) HECKENROTH. *Ces Annales*, 32, 1918, p. 389.

(2) CAVASSE, Rapport du mois de novembre 1912, Hôpital indigène de Conakry-Guinée.

(3) L. TEPPAZ. *Bull. Soc. de Path. exot.*, 3, 1910, p. 351.

un virus autochtone ou à un virus importé. D'après Remlinger et Curasson (1), le vétérinaire Ollivier, en mission au Sénégal en 1815, signalait chez les chiens une affection qui lui paraissait être la rage, mais « beaucoup moins forte ».

L'importation de la rage classique en Afrique a permis à certains auteurs de soutenir que les cas de rage humaine étaient toujours imputables à ce virus, jamais au virus d'Oulou-fato, qui serait inoffensif pour l'homme.

*
* *

Deux théories extrêmes sont donc actuellement en présence : pour les uns, le virus rabique et le virus de l'Oulou-fato sont tout à fait différents ; pour les autres, il ne s'agirait que d'un seul virus. Remarquons, cependant, que les partisans les plus convaincus de la spécificité de l'Oulou-fato ne consentiraient pas à prendre la responsabilité de déconseiller le traitement anti-rabique à toute personne contaminée par un chien fou. La question est donc jugée *du point de vue pratique*, mais il est cependant intéressant de discuter la valeur des arguments que l'on fait valoir en faveur de la spécificité absolue du virus de l'Oulou-fato.

Nous allons voir, dans les pages suivantes, combien il est malaisé de se faire une opinion précise par l'étude des tentatives déjà faites avec le but de résoudre la question.

Il convient tout d'abord de remarquer que la maladie du chien fou se manifeste cliniquement, le plus souvent, par la forme mue, se caractérisant par la rareté des accès furieux et la prédominance des symptômes paralytiques, le peu de tendance à mordre et la rapidité de son évolution. Cette maladie ressemble donc par sa symptomatologie à la rage canine européenne et il faut convenir qu'il est impossible d'établir entre les deux infections un diagnostic différentiel.

Au point de vue expérimental, le virus de l'Oulou-fato n'aurait aucune tendance à se « fixer » sur les lapins. Nous verrons la valeur de cet argument, en passant en revue les travaux qui ont été consacrés à cette question, et en ajoutant nos propres résultats d'expérience.

(1) REMLINGER et CURASSON. *Bull. de l'Acad. de Méd.*, 92, 1924, p. 1112.

G. Bouffard (1) [1912], a pu réaliser avec la substance bulbaire d'un chien fou treize passages sur lapin. La durée de l'incubation fut en moyenne de quinze à vingt jours, deux fois de trente-cinq à trente-huit jours. L'état général des animaux se maintenait excellent jusqu'à deux à trois jours avant la mort; celle-ci était précédée de signes de parésie suivis de paralysie complète du train postérieur. Et Bouffard conclut que la rage canine existe au Soudan, bien que la rage humaine y paraisse inconnue. Pour lui, l'Oulou-fato est donc bien une maladie due au virus rabique.

Avec les cerveaux de deux chiens errants capturés au Sénégal le long de la voie ferrée, Heckenroth (2) a réussi à infecter des lapins. Mais, en raison du fait que les animaux ont été capturés dans une région où pouvaient se trouver des chiens européens, nous ne savons pas s'il s'agissait véritablement de chiens fous. Heckenroth a pu effectuer treize passages avec le virus rabique du Sénégal (virus Mekkhé). Il signale que ce virus ne paraît avoir aucune tendance à se « fixer ». Mais l'auteur constate de fortes variations dans les périodes d'incubation avec le virus fixe de Paris entretenu à Dakar. Et Heckenroth conclut prudemment : « Tout en admettant que l'on rencontre, au Sénégal comme au Soudan, un virus rabique normalement non transmissible à l'homme, rien n'est venu démontrer jusqu'ici que le virus indigène n'est pas capable, sous certaines conditions encore inconnues, de devenir virulent pour l'homme (3). »

Arlo [1921] (4), au laboratoire de Bamako, a essayé sans succès de fixer le virus soudanais. Il n'a même pas réussi à faire quelques passages. Dans une première tentative, il s'est servi du bulbe d'un chien fou; seul le premier lapin de cette série mourut le douzième jour, après avoir présenté de la paralysie du train postérieur vingt-quatre heures auparavant. Dans une deuxième série, un lapin inoculé avec le cerveau d'un autre chien succomba le vingt et unième jour, avec une paralysie du train postérieur survenue trois jours avant la mort.

(1) G. BOUFFARD. *Ces Annales*, 26, 1912, p. 727.

(2) HECKENROTH. *Loc. cit.*

(3) Une observation de rage humaine au Sénégal, relatée en 1920 par Noc et Kerneis, est sans intérêt particulier, car la victime avait été mordue par un chien errant dont l'origine du virus était inconnue.

(4) ARLO. *Bull. Soc. Path. exot.*, 14, 1921, p. 363.

Un deuxième lapin mourait le vingt-septième jour après avoir présenté de la paralysie et des convulsions. Arlo est également d'avis que la rage soudanaise n'est pas transmissible à l'homme.

Bouffard (1), en 1921, insiste de nouveau sur ce fait que, malgré une certaine fréquence de la rage canine en Afrique, on n'observe pas cette maladie chez l'homme. Les enquêtes qu'il a faites au Soudan et au Dahomey, les recherches dans les Archives du Service de Santé pour y trouver mention de cas de rage humaine, sont restées infructueuses.

Avec le bulbe d'un chien fou, cet auteur a réussi à faire vingt-huit passages dont cinq sur lapins et vingt-trois sur cobayes. Les lapins présentaient une rage du type paralytique, les cobayes montraient le plus souvent une vive agitation précédant la mort de vingt-quatre heures. Mais l'auteur a constaté que ce virus du Dahomey n'avait aucune tendance à se fixer (peut-être parce qu'il n'a pas fait un nombre suffisant de passages sur lapin).

Remlinger, M. Leger et Teppaz (2) ont fait des expériences pour savoir comment, d'une part, se comporteraient à Dakar le virus fixe et le virus des rues de Tanger, d'autre part, le virus des rues de Dakar, à Tanger.

Le virus rabique se comporte au Maroc absolument comme en France. Il résulte de leurs expériences :

- a) Que le virus fixe de Tanger se comporte à Dakar comme à Tanger, c'est-à-dire comme à Paris même ;
- b) Que le virus des rues du Maroc se comporte au Sénégal comme au Maroc, c'est-à-dire comme en France ;
- c) Que le virus du Sénégal se comporte au Sénégal comme au Maroc et dans ces deux pays comme en France.

Si intéressantes que soient ces constatations, elles ne nous renseignent pas, comme du reste les auteurs le font remarquer, sur les propriétés du virus africain indigène, car il y a toute probabilité pour que le virus des rues du Sénégal, avec lequel ils ont expérimenté, soit un virus importé et non le virus du chien fou.

(1) G. BOUFFARD. *Bull. de la Soc. Path. exot.*, **14**, 1921, p. 6.

(2) REMLINGER, MARCEL LÉGER et TEPPAZ. *Bull. de la Soc. Path. exot.*, **16**, 1923, p. 4.

Remlinger et Curasson (1) en 1924, ayant pu se procurer un virus de chien fou dont l'authenticité ne leur paraissait pas douteuse, l'ont comparé à un virus des rues de Tanger. Ils ont constaté, par une expérience d'immunité croisée, qu'ils se comportaient d'une façon identique. Vaccinés avec l'un ou avec l'autre virus, les lapins, éprouvés par inoculation sous-durémérienne, ont tous succombé à la rage (ce qui n'est pas fait pour surprendre), mais avec des retards sur les témoins. Au contraire, les lapins vaccinés, éprouvés par une inoculation dans la chambre antérieure ont tous résisté, à une exception près, alors que les témoins succombaient à la rage. Pour Remlinger et Curasson, l'identité du virus rabique classique et du virus d'Oulou-fato ressort nettement de cette expérience. Ils conclurent donc que toute personne contaminée par un chien fou doit se soumettre au traitement antirabique, absolument comme si elle avait été contaminée par un animal atteint de la rage.

Evidemment, ces expériences ne sont pas tout à fait concluantes, puisque la manière d'éprouver l'état réfractaire acquis des lapins, par inoculation intra-oculaire, n'est pas la meilleure. Nous avons utilisé la voie cérébrale pour éprouver la résistance des animaux immunisés, et les résultats ont montré d'une manière indubitable qu'il existe une parfaite immunité croisée entre les virus rabiques classiques et le virus de la maladie d'Oulou-fato (2).

Levaditi, Nicolau et Schoen (3) ont réussi, en 1926, à transformer une souche de virus du chien fou en virus fixe, après un grand nombre de passages. Une deuxième souche, soumise au passage de cerveau à cerveau en série, s'est montrée entre les mains de ces auteurs, « non mutable », même après quarante-deux passages sur le lapin. Une de ces deux souches, envoyées par M. Remlinger (4), avait servi à cet auteur pour faire les expériences d'immunité croisée signalées plus haut.

L. Delpy, Cauvin et Riou (5), en 1929, ont observé à Gao

(1) REMLINGER et CURASSON. *Loc. cit.*

(2) NICOLAU, MATHIS et CONSTANTINESCO. *Bull. Soc. Path. exot.*, 24, 1931, p. 931.

(3) LEVADITI, NICOLAU et SCHOEN. *Ces Annales*, 40, 1926, p. 973.

(4) REMLINGER. *Ces Annales*, 40, 1926, p. 1070.

(5) DELPY, CAUVIN et RIOU. *Bull. Soc. Path. exot.*, 22, 1929, p. 631

(Soudan français) un cas de rage provoquée chez l'homme par la morsure d'un chien fou, et un autre chez un guépard mordu également par un animal atteint d'Oulou-fato. Pour M. Leger, la preuve n'a pas été faite que les deux animaux mordeurs n'avaient pas été mordus eux-mêmes par un chien atteint de la rage classique importée d'Europe. D'après lui, on doit admettre qu'à côté de la rage des rues européenne, importée sur la côte d'Afrique, il existe une souche locale non susceptible de contaminer l'homme. Ce virus des rues, non dangereux pour l'homme, existerait non seulement en Afrique occidentale française, mais aussi en Afrique équatoriale. A l'appui de la thèse de l'innocuité de l'Oulou-fato pour l'homme, A. Leger (1) rapporte, en 1929, les observations de 4 Européens mordus par des chiens enragés et qui n'avaient pas contracté la rage. De ces 4 chiens mordeurs, l'un est déclaré chien errant, atteint d'Oulou-fato; les propriétaires des 3 autres étaient connus. Mais il n'est pas fait la preuve que ces chiens étaient réellement des chiens fous et n'avaient pas été contaminés par le virus rabique classique. Pour A. Leger, le virus de l'Oulou-fato aurait la propriété de ne pouvoir être conservé sur lapin, car il se perd au bout d'un certain nombre de passages.

Remlinger (2), en 1930, s'éleva fortement contre les conclusions que A. Leger a tirées de ces observations. Il rappelle qu'avant la découverte de la vaccination antirabique la mortalité chez les personnes mordues par des animaux enragés oscillait, suivant le siège, le nombre et la gravité des morsures, entre 12 et 58 p. 100, c'est-à-dire que de 42 à 88 personnes sur 100 échappaient à la maladie. Des faits négatifs rapportés par A. Leger, on ne saurait donc conclure que le virus soudanais est un virus rabique spécial, non transmissible du chien à l'homme par morsure.

Le fait que les virus des rues du Soudan puissent perdre leur virulence pour le lapin au cours des passages doit être admis sous réserve. Heckenroth avait également soutenu que le virus fixe de l'Institut Pasteur de Paris subissait au Sénégal de grandes variations. Or, les expériences entreprises par Remlinger et ses

(1) A. LÉGER. *Bull. Soc. Path. exot.*, 22, 1929, p. 907.

(2) REMLINGER. *Bull. Soc. Path. exot.*, 23, 1930, p. 167.

collaborateurs ne sont pas en faveur de ces différences de comportement. Il est permis de supposer que les expérimentateurs qui ont échoué à fixer le virus de l'Oulou-fato sur lapins auraient réussi s'ils avaient été placés dans des meilleures conditions.

On ne peut, croyons-nous, mettre en doute l'authenticité du virus indigène avec lequel Remlinger et Curasson ont procédé à leurs expériences d'immunité croisée. Ce virus a été recueilli avec toutes les garanties possibles. Si son authenticité est contestée, le même doute pourrait se manifester pour n'importe quel virus provenant du chien fou, et on n'arrivera jamais à une solution de la question. Quoi qu'il en soit, du point de vue pratique, les partisans de la dualité du virus rabique doivent se rallier à ceux qui soutiennent son unicité, car étant donnée l'impossibilité de savoir si une personne a été contaminée par un chien fou ou par un animal atteint de la rage classique, il sera toujours prudent de la soumettre à la vaccination anti-rabique.

P. Dabbadie (1) est venu apporter une observation qui plaide en faveur de la thèse de l'unicité. Il a pu procéder en Haute Volta à des inoculations expérimentales avec un virus rabique autochtone. Pour l'auteur, il s'agit bien d'un chien fou, car il n'y aurait jamais eu, à Ougadougou, de chiens importés d'Europe. Le fait était facile à contrôler dans une localité de 300 Européens, située à plus de 100 kilomètres du chemin de fer, et à plusieurs centaines de kilomètres de la côte.

Pour M. Leger (*loc. cit.*), les observations de Dabbadie ne sont pas convaincantes, car on ne sait pas si l'Européen mordu, soumis par la suite au traitement antirabique, aurait ou non contracté la rage. Mais cette objection n'aurait aucune valeur, d'après Remlinger, puisque nous savons que, même dans le cas de rage classique, toutes les personnes mordues même non traitées, ne contractent pas la rage. M. Leger trouve également insuffisants les 3 passages faits sur lapins et sur cobayes par Dabbadie. Le travail de Curasson et Dischamps [1931] (2) répond à cette objection. Avec le virus du chien fou de Dabbadie, ces auteurs ont réussi à faire 11 passages successifs sur cynocéphales, pas-

(1) P. DABBADIE. *Bull. Soc. Path. exot.*, **23**, 1930, p. 857.

(2) CURASSON et DISCHAMPS. *Bull. Soc. Path. exot.*, **24**, 1931, p. 154.

sages qui se sont échelonnés du 19 décembre 1929 au 30 mars 1930, sans modification de la virulence de la souche. La mort survenait régulièrement de huit à dix jours; après le douzième passage sur cynocéphale, le virus s'est montré nettement virulent pour le lapin, puis pour le cobaye. Ils sont donc d'avis que leurs expériences constituent un nouvel argument en faveur de l'unicité du virus rabique en Afrique occidentale française.

Ajoutons que dans un travail récent Delorme (1) étudie une épizootie de rage observée à Kindia (Guinée française). Pour l'auteur, le nombre de chiens importés d'Europe est certainement la principale cause de l'extension de la rage en Guinée. L'étude histo-pathologique de cerveau de certains « chiens fous » a permis à Delorme d'affirmer la présence de corps de Negri dans les neurones de la corne d'Ammon.

De la lecture de l'ensemble des travaux publiés sur l'Oulou-fato, on acquiert la conviction que la maladie du chien fou est une rage canine. Cliniquement, il est impossible de faire un diagnostic différentiel avec la rage telle qu'on l'observe en Europe. L'argument tiré du fait que le virus du chien fou n'a aucune tendance à se fixer sur lapins repose sur des expériences pratiquées dans de mauvaises conditions. Le fait de l'innocuité du virus du chien fou pour l'homme, même si cette innocuité était presque la règle, ne prouverait pas qu'il s'agisse d'un virus autre que celui de la rage. On pourrait même admettre qu'il existe plusieurs souches d'Oulou-fato, dont certaines, rares, seraient transmissibles à l'homme (cas de Cavasse, et le cas décrit par nous plus loin), tandis que les autres ne le seraient pas; en réalité, nous croyons que le virus d'Oulou-fato est un virus rabique de virulence atténuée, et que les rares infections rabiques humaines occasionnées par les morsures de chiens fous seraient redevables plutôt à la réceptivité particulière de quelques-uns des sujets mordus qu'à l'agressivité des germes. Nous discuterons à nouveau cette question après avoir exposé nos propres recherches expérimentales sur ce virus.

(1) DELORME. *Bull. de l'Acad. de Méd.*, 106, 1931, p. 103.

**Origine du virus de chien fou
ayant servi dans nos expériences.**

La question du virus du chien fou se trouvait toujours en discussion, lorsqu'il nous a été donné de pouvoir commencer l'étude d'une scuche, isolée par l'un de nous à Dakar. Mais, alors que les expérimentateurs qui nous ont précédés avaient prélevé les centres nerveux sur le cadavre d'un chien, l'origine de notre virus provient d'un cas humain. Le 10 janvier 1931, un enfant âgé de quatre ans était évacué de Matam (Sénégal), sur l'Institut Pasteur de Dakar. Il avait été mordu le 21 décembre 1930 par un chien indigène errant. L'administrateur de Matam nous affirme *de la façon la plus formelle qu'il n'existe aucun chien européen importé*. L'enfant, qui présentait deux morsures assez profondes à l'avant-bras gauche, commença le traitement le 10 janvier 1931, le jour de son arrivée à l'Institut Pasteur de Dakar. Jusqu'au 26 janvier, on ne remarqua chez lui rien d'anormal. Il était gai et il jouait. Vers 11 heures de ce jour, il donna des signes d'une agitation inaccoutumée se traduisant par une envie de courir. Il mangea ce jour-là comme d'habitude, mais on s'aperçut que la déglutition des liquides entraînait une certaine constriction du pharynx. Dans la soirée, il accusa une soif intense, mais refusa de boire. Il se coucha sans trop d'agitation et mourut dans la nuit sans attirer l'attention de ses voisins de lit qui ne constatèrent sa mort qu'à leur réveil. Cette mort subite surprit beaucoup les médecins de l'hôpital.

L'autopsie fut pratiquée aussitôt et un fragment du bulbe fut immergé dans de la glycérine.

Des coupes à la paraffine ont été faites en plusieurs régions de l'encéphale de cet enfant. Il nous a été difficile de faire une étude complète de ces coupes, les circonstances et les moyens techniques n'étant pas propices. Malgré tout, dans certaines coupes passant par la corne d'Ammon, nous avons rencontré des corps de Negri caractéristiques, de petites dimensions.

Étude expérimentale.

Huit jours après l'autopsie de l'enfant, une émulsion de son bulbe glycérimé est inoculée sous la dure-mère d'un lapin, qui devient paralysé le treizième jour et meurt huit jours plus tard, c'est-à-dire vingt et un jours après l'inoculation. Un autre lapin, inoculé également dans le cerveau avec une émulsion de bulbe glycérimé provenant de l'enfant mort, se paralyse le dix huitième jour et meurt treize jours plus tard, le trente et unième jour. Un passage fait — en partant du cerveau du premier animal — dans l'encéphale d'un nouveau lapin amène la mort en vingt jours, après deux jours d'état paralytique. Un fragment du cerveau de ce dernier animal est apporté à l'Institut Pasteur de Paris, où nous avons étudié les propriétés de cette souche de virus d'Oulou-fato isolée chez l'homme.

Disons dès maintenant qu'il s'agit bien d'un virus rabique, parce que :

a) Dans le protoplasme des neurones de la corne d'Ammon (et ailleurs, chez les lapins de passage, on constate la présence de nombreuses inclusions ayant plus d'une ressemblance avec les corps de Negri. Nous reviendrons sur les particularités de ces inclusions.

b) L'inoculation de notre virus de chien fou, passé trois fois par le cerveau de lapins, sous la dure-mère d'un lapin fortement immunisé contre la rage classique (et ayant déjà résisté à plusieurs inoculations cérébrales de virus rabiques européens des rues), n'engendre aucun symptôme morbide ; l'animal survit tandis que deux lapins neufs, témoins, inoculés par la même voie et avec la même émulsion de virus d'Oulou-fato, succombent tous les deux le dix-huitième jour, après un état paralytique de quatre jours, avec des altérations histologiques typiques dans le névraxe et des inclusions cytoplasmiques caractéristiques au niveau de la corne d'Ammon.

Fixation du virus sur lapins.

Nous donnerons quelques détails (1) sur le mécanisme de l'adaptation de ce germe à l'organisme du lapin et de sa transformation en virus fixe. Précisons que nous acceptons le terme de « virus fixe » dans son sens pastorien : virus rabique dont l'inoculation sous-dure-mérienne confère au lapin une maladie dont l'incubation et l'évolution se font en un nombre de jours peu variable, et ceci, sans rien préjuger quant au nombre et aux dimensions des corps de Negri. D'ailleurs, et comme nous le montrerons plus loin pour cette souche d'Oulou-fato, ces inclusions ne différencient pas d'une manière catégorique les virus des rues des virus fixes, puisque, dans l'encéphale des lapins morts de la maladie produite par certains germes « fixés », il existe des corps de Negri, parfois en grand nombre, ainsi que l'a montré récemment l'un de nous en collaboration avec Kopciowska (2).

Voici le point de départ de nos expériences faites à l'Institut Pasteur de Paris avec le virus d'Oulou-fato :

Le 24 avril 1931, nous inoculons une émulsion du virus cérébral glycérimé de lapin apporté de Dakar, dans le cerveau de 2 lapins ; un de ces animaux meurt le lendemain d'une méningite septique, l'autre ne montre rien de particulier pendant plus de deux mois d'observation.

Le 27 avril, le même cerveau apporté de Dakar sert à faire une émulsion qui est inoculée également à 2 lapins, par voie sous-dure-mérienne ; résultats toujours négatifs.

Enfin, le 4 mai, donc sept jours plus tard, nous inoculons encore 4 lapins avec ce même virus africain glycérimé : 2 lapins reçoivent l'émulsion cérébrale sous la dure-mère, et 2 dans les muscles de la nuque. Un des deux animaux inoculés dans le cerveau meurt vingt-trois jours plus tard ; il a servi de tête de série pour tous nos passages.

(1) NICOLAU, MATHIS et CONSTANTINESCO. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **110**, 1932, p. 433.

(2) NICOLAU et KOPCIOWSKA. *C. R. de l'Acad. des Sc.*, **194**, 1932, p. 1863.

On voit ainsi que le départ des passages a été laborieux; et sans une certaine persévérance, toujours nécessaire dans ce genre de travail, nous aurions pu conclure — après les deux premières séries d'inoculations négatives — au manque de virulence du matériel glycéринé apporté de Dakar.

Donc, le germe puisé dans le bulbe de l'enfant mort de cette rage africaine, introduit dans le cerveau des lapins, à Dakar ou à Paris, a conféré la mort des animaux en vingt et un; trente et un, vingt et vingt-trois jours, après des périodes de paralysie variant entre deux et treize jours (respectivement de huit, treize, deux et six jours). Dès lors, nous étions en possession du virus de chien fou passé trois fois, en série, par le cerveau des lapins.

Le cerveau du troisième lapin de la série (celui mort à Paris en vingt-trois jours) sert à inoculer, toujours par voie sous-dure-mérienne, plusieurs animaux dont chacun constitue la tête d'une nouvelle lignée de passages qui seront continués pendant longtemps. Les lapins de l'une de ces séries meurent comme il suit : le premier en treize jours; les autres respectivement en vingt, dix-neuf, dix-huit et vingt-quatre jours; enfin, une émulsion d'un fragment d'encéphale du lapin mort en vingt-quatre jours (lapin 577R, le cinquième de cette ligne), inoculée dans le cerveau du lapin 623R, ne produit plus aucun symptôme et l'animal survit. Reprise de la glycérine après un séjour de vingt jours à la glacière, la substance cérébrale du lapin 577R s'est montrée toujours avirulente (1). Les lésions intenses histopathologiques du névraxe du lapin 577R ont montré que l'animal était bien mort de rage (v. fig. 26, p. 834); mais la faible activité pathogène des germes inoculés a permis au tissu nerveux de supprimer totalement leur virulence, dans la lutte qui se traduisait morphologiquement par des réactions tissulaires très intenses et au niveau desquelles les corps de

(1) Les expériences de Perdrau et Dafano (*J. of. Path. and. Bact.*, 30, 1927, p. 67), de Nicolau et Kopciowska (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 104, 1930, p. 965), ont montré que le virus herpétique, non décelable par inoculation, chez certains lapins morts d'infection « autostérilisée » en apparence, peut être mis en évidence par inoculation cérébrale, après un séjour à la glacière dans de la glycérine. Ce processus de réactivation des germes à l'aide de la glycérine n'a pas pu être reproduit par Nicolau et Kopciowska (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 104, 1930, p. 1139) dans leurs expériences sur le cerveau d'animaux morts de rage « autostérilisée ».

Negri étaient nombreux (1). Il s'agit donc d'un cas d'autostérilisation mortelle de neuro-infection rabique (2).

Une deuxième lignée de passages s'est arrêtée également, par le même mécanisme d'autostérilisation.

D'autres séries de passages nous ont permis, par contre, de transformer notre souche de virus des rues en virus fixe. Suivons les courbes tracées d'après trois lignées de passages (fig. 1). Le tracé A, irrégulier, représente une série de sept passages dont le dernier lapin a fait une encéphalo-myélite rabique autostérilisée. Le tracé B, composé de trente passages en ligne directe, présente une particularité : le quatrième passage a été fait dans le cerveau d'un singe (*Macacus rhesus*) qui en est mort le vingtième jour. La courbe apparaît au début irrégulière, le nombre de jours nécessaires pour amener la mort des animaux étant très variable ; plus tard, après le quinzième passage et jusqu'au trentième, la souche, transformée en un virus fixe, tue les lapins entre dix et douze jours. Le tracé C est le plus régulier ; à partir du dixième passage, le virus devient fixe et tue les animaux en huit ou neuf jours, plus rarement en dix jours. Il est peut-être intéressant de constater que les animaux de la lignée C meurent en général plus tôt que ceux de la lignée B. Remarquons que tous les lapins utilisés dans ces expériences pesaient approximativement le même poids (2.000 à 2.500 grammes) ; les émulsions inoculées étaient

(1) NICOLAU et GALLOWAY (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 99, 1928, p. 674) ont été les premiers à démontrer la présence d'inclusions dans des cas de neuro-infections autostérilisées, mortelles ou non, au cours de leurs travaux sur l'encéphalo-myélite enzootique. Par la suite, Remlinger a réussi à mettre en évidence des inclusions (corps de Negri) chez certains lapins morts de rage autostérilisée. Le cas relaté plus haut entre dans le cadre des infections rabiques autostérilisées avec présence d'inclusions spécifiques.

(2) Les cas d'autostérilisation mortelle dans le domaine des infections neurotropes résultent évidemment de la lutte particulièrement intense menée par le tissu sensible contre les germes qu'on y introduit. Or, le système nerveux des lapins normaux est très sensible vis-à-vis des virus rabiques habituels et n'arrive pas à s'en débarrasser par ses réactions. Normalement, on le sait, les lapins font une rage mortelle avec présence de germes dans leur névraxe. Force nous est donc de conclure que, dans notre cas d'autostérilisation mortelle, la souche de germes inoculés était beaucoup moins virulente que les souches rabiques habituelles et que le manque d'agressivité du virus a permis au tissu sensible de s'en débarrasser. Ainsi, nous croyons, à l'encontre de l'opinion de Remlinger (*Bull. Soc. Path. exot.*, 25, 1932, p. 118), que la souche de virus de chien fou en notre possession était à l'origine une souche peu virulente.

faites de la même manière, ainsi que les inoculations, l'opérateur étant toujours le même (Nicolau). Pourquoi cette différence persistante d'incubation dans deux lignées de passages issues d'une même souche ? Le fait d'avoir introduit un singe dans les premiers passages de la lignée B aurait-il pu suffire à l'expliquer ? Ou s'agit-il d'un autre facteur, fortuit — peut-être le comportement particulier (sensibilité plus ou moins accentuée)

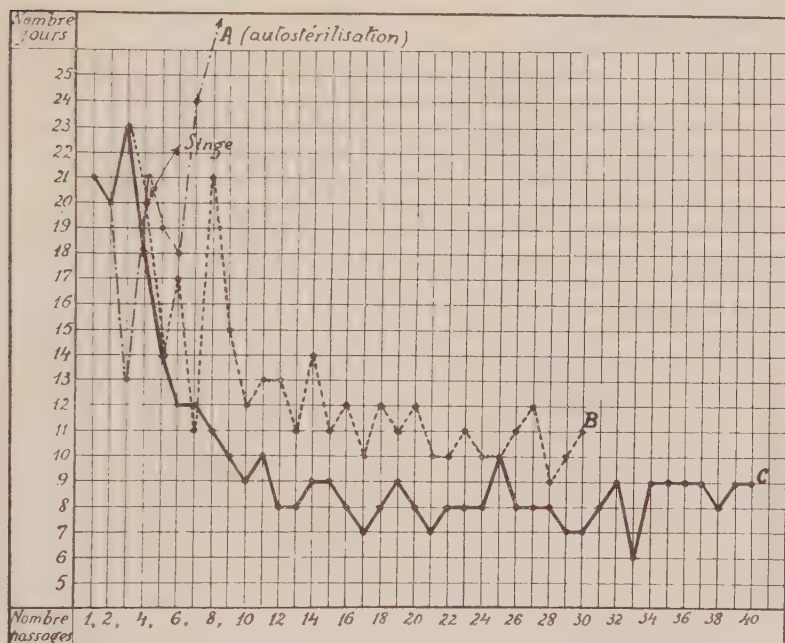


FIG. 1. — Montrant trois lignées de passages de cerveau à cerveau : lignée A, avortée ; lignées B et C, transformation du virus des rues en virus fixe.

d'un ou de plusieurs animaux dans une série de passages — pouvant imprimer au germe la tendance à se fixer avec un délai d'incubation plus ou moins court ? Quoi qu'il en soit, nous constatons qu'une même souche de virus rabique a donné naissance à deux virus fixes : l'un tuant l'animal inoculé dans le cerveau en huit à dix jours, l'autre en dix à douze jours.

Ces considérations mises à part, nous avons établi une autre courbe (fig. 2) indiquant, sur 100 lapins, le nombre d'animaux morts après un nombre déterminé de jours. Ces 100 lapins

proviennent de la lignée B (du quinzième au trentième passage), de la lignée C (du dixième au quarantième passage), ainsi que de deux autres lignées non inscrites dans la figure 1. On constate qu'un grand nombre de ces lapins inoculés sous la dure-mère avec notre souche de virus d'Oulou-fato fixe meurent le huitième et le neuvième jour (54 p. 100) ; 17 p. 100 sont morts le dixième jour ; 8 p. 100 le onzième jour ; 6 p. 100 le septième

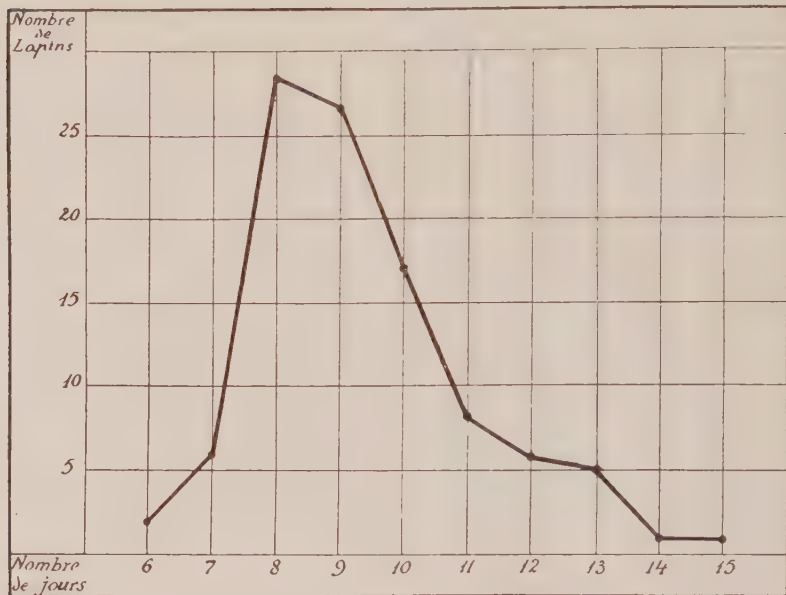


Fig. 2. — Indiquant le nombre d'animaux morts après un nombre déterminé de jours, à la suite de l'inoculation cérébrale de virus fixe à 100 lapins.

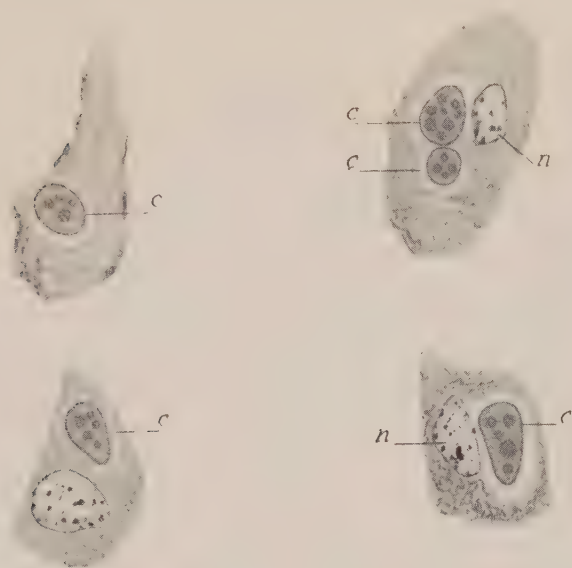
ainsi que le douzième jour ; 5 p. 100 le treizième jour ; 2 p. 100 le sixième et 1 p. 100 le quatorzième et le quinzième jour.

Le comportement des inclusions cytoplasmiques
(corps de Negri)
pendant la transformation du virus des rues en virus fixe.

Au début des passages de notre souche dans le cerveau des lapins, l'étude histologique de l'encéphale mettait en évidence

au niveau de la corne d'Ammon, du noyau optique basal et de l'écorce, des corps de Negri volumineux, nombreux. La figure 3 montre de tels corps. Nous reviendrons sur les caractéristiques des inclusions trouvées dans la maladie conférée au lapin par notre virus.

Au fur et à mesure du nombre des passages sur lapins, dans



C.C.

FIG. 3. — Lapin 432 R (le 3^e passage de la lignée c), mort 23 jours après l'inoculation sous-dure-mérienne de *virus des rues*: cellules nerveuses de la corne d'Ammon renfermant dans le cytoplasme de gros corps de Negri; n, noyau; c, corps de Negri volumineux, à structure complexe. Coloration Giemsa; gross. 4/1000.

chaque lignée, le nombre et la dimension de ces inclusions ont diminué. Malgré cela, nous pouvons affirmer que leur taille et leur abondance dans le tissu nerveux n'est pas toujours en rapport avec la durée de la maladie. Ainsi, le lapin 652 R, mort le quinzième jour, présentait 21 inclusions pour 100 neurones comptés dans les deux cornes d'Ammon, et ces inclusions

étaient petites, les plus volumineuses atteignant environ 2-3 μ . Par contre, le lapin 701 R, mort le huitième jour, présentait 22 inclusions pour 100 neurones comptés aux mêmes endroits, et les inclusions étaient pour la plupart très volumineuses, atteignant parfois la dimension de 8-10 μ . Nous avons enregistré souvent de telles constatations.

Après une vingtaine ou une trentaine de passages cérébraux



FIG. 4. — Lapin 787 R (le 24^e passage de la lignée C), mort 8 jours après l'inoculation cérébrale de *virus fixe*. Dans la rangée de neurones de la corne d'Ammon, on voit deux petits corps de Negri (c) dans le cytoplasme de deux cellules; v, petit vaisseau avec deux hématies dans sa lumière. Coloration Giemsa; gross. 1.000.

en ligne directe, on rencontre rarement de gros corps de Negri dans la corne d'Ammon et dans l'écorce. Les inclusions qu'on y trouve sont rares, la plupart petites et dépourvues de plages chromatiques (fig. 4). Pourtant, il existe toujours une région où les corps de Negri restent nombreux et de dimensions importantes : c'est le *noyau optique basal*, d'où ils ne disparaissent jamais. Ce fait ne doit pas surprendre, puisque l'un de

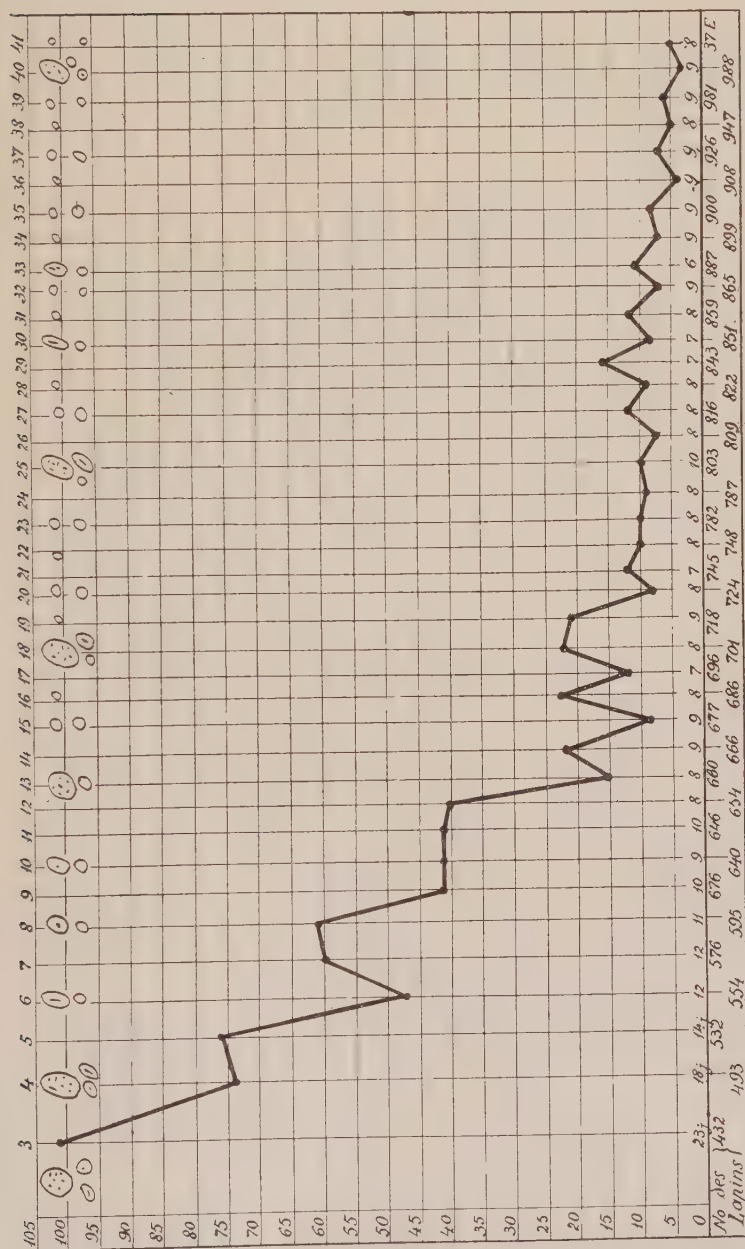


FIG. 5. — Courbe dressée d'après les 41 passages de cerveau à cerveau de la lignée C, montrant les variations quantitatives et qualitatives des corps de Negri au fur et à mesure des passages.

nous, avec M^{me} Kopciowska, a montré que des souches de virus rabique passées depuis des années et sur des centaines de lapins (*souche DK*), et même depuis des dizaines d'années sur des milliers d'animaux (*souche de virus fixe Pasteur*), présentent d'une manière constante des corps de Negri dans le noyau optique basal (1).

Nous avons établi plusieurs courbes qui montrent la diminution du nombre des corps de Negri au niveau de la corne d'Ammon, au fur et à mesure des passages cérébraux de notre souche de rage. Les inclusions mises en évidence sur des coupes à la paraffine par la coloration au Giemsa lent (2) étaient comptées dans 50 neurones de chaque corne d'Ammon. On a inscrit dans les courbes le nombre d'inclusions cytoplasmiques trouvées ainsi chez chaque lapin de passage dans 100 cellules nerveuses de la corne d'Ammon. La courbe de la figure 5 (lignée C) montre les variations quantitatives et qualitatives des corps de Negri dans une série de quarante et un passages de cerveau à cerveau, sur lapins.

Nous avons tenu compte du volume des inclusions cytoplasmiques, en marquant sur la même courbe les aspects schématiques. L'abscisse représente, pour chaque passage, le nombre de jours écoulés depuis l'inoculation sous-dure-mérienne jusqu'à la mort de l'animal rabique; sur les ordonnées a été marquée la fréquence des corps de Negri. Les chiffres inscrits horizontalement sur la ligne 105 indiquent le numéro d'ordre du passage; les chiffres placés au-dessous de la ligne 0 désignent le lapin rabique examiné.

La courbe de la figure 6, dressée de la même manière que la précédente, et qui représente la lignée de passage B, rassemble les résultats obtenus sur une série de 32 lapins.

Deux autres courbes, dressées d'après deux autres lignées de passages, ont, à peu de choses près, le même aspect que les précédentes.

Il est ainsi évident, qu'au niveau de la corne d'Ammon, le

(1) NICOLAU et KOPCIEWSKA. *C. R. de l'Acad. des Sc.*, 194, 1932, p. 1865.

(2) LEVADITI, NICOLAU et SCHOEN ont préféré cette coloration pour la recherche des corps de Negri dans les cas de rage produite aux lapins par des souches de virus des rues en cours de fixation. Ces *Annales*, 40, 1926, p. 973.

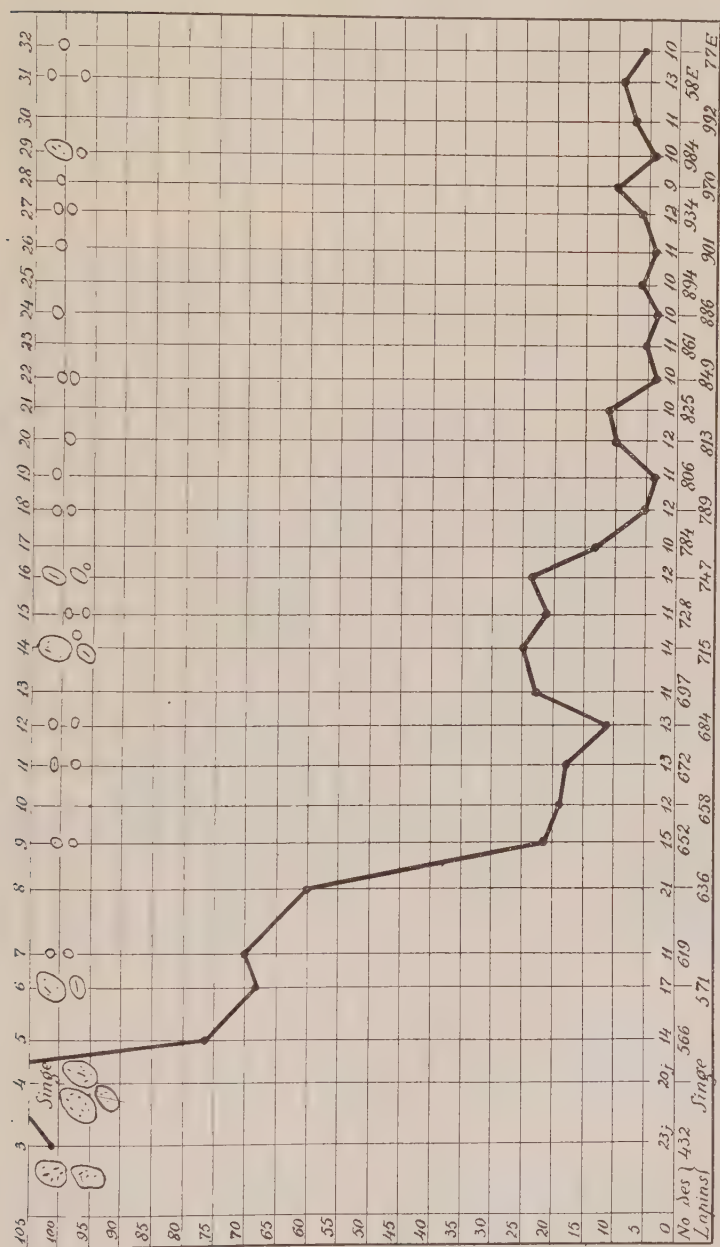


FIG. 6. — Résultats de l'étude des corps de Negri dans la lignée de passages B (32 passages).

nombre et la taille des corps de Negri diminuent au fur et à mesure du nombre de passages faits dans une même lignée. *Mais cette constatation n'est valable que pour la corne d'Ammon. La disparition des inclusions pendant le processus de fixation d'une souche de rage des rues ne se fait pas d'une manière parallèle dans toutes les régions de l'encéphale* (1); les corps de

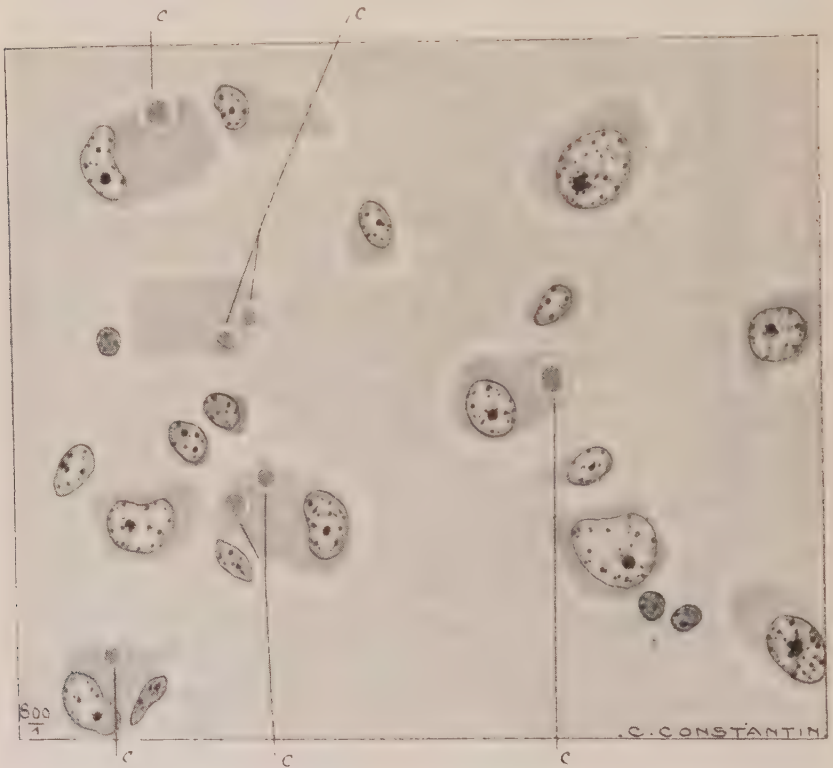


FIG. 7. — Lapin 787R (le même lapin, mort de rage à virus fixe, de la figure 4). La figure montre une portion du *noyau optique basal*. L'abondance en corps de Negri et les fortes dimensions de ces corps contrastent avec la rareté et la petitesse de ces inclusions au niveau de la corne d'Ammon; c, corps de Negri. Coloration Giemsa, gross. : 800.

Negri persistent très abondants au niveau du noyau optique basal, même après la transformation du virus des rues en virus

(1) NICOLAU et KOPCIEWSKA. C. R. de la Soc. de Biol., 112, 1933, p. 445.

fixe (fig. 7 et 8). Quelques chiffres illustrent cette affirmation. Le tableau de la figure 9 montre ce manque de parallélisme dans la diminution du nombre et des dimensions des corps de Negri dans la corne d'Ammon et dans le noyau optique basal.

Comment trouver dans un cerveau de lapin cette dernière région ?

Le schéma de la figure 10 montre la technique qu'on doit suivre pour avoir sur les coupes d'encéphale le noyau optique basal.

En résumé, la souche de virus d'Oulou-fato isolée par nous

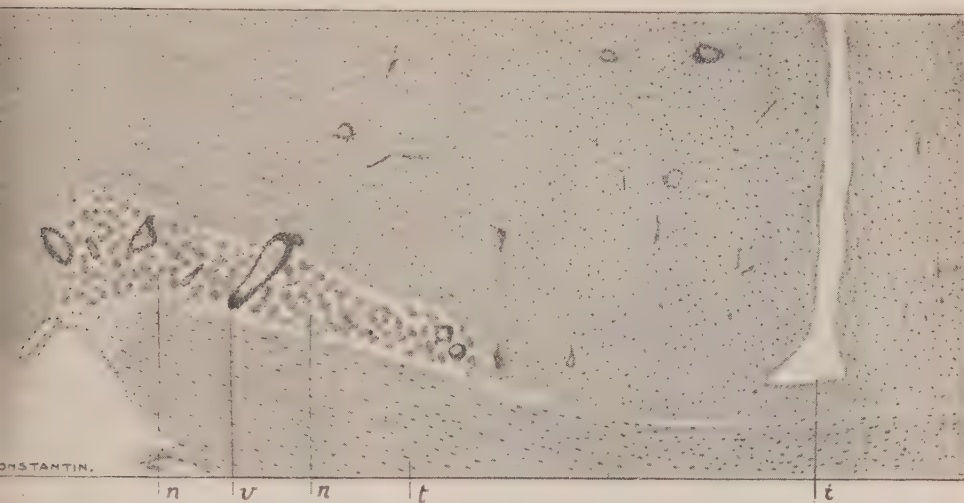


FIG. 8. — Même lapin que dans les figures 4 et 7; aspect du noyau optique basal *n*; *i*, infundibulum; *v*, processus de périvasculature; *t*, tractus optique. Coloration Giemsa, gross. : 40.

chez l'homme se montre au début des expériences peu virulente pour le lapin : en effet, on se rappelle les échecs essayés au commencement des essais d'adaptation de cette souche au névraxe de cette espèce animale, ainsi que les deux arrêts, par « neuro-infection mortelle autostérilisée », de deux de nos séries de passages.

Une fois ce virus des rues transformé en virus fixe, il se montre assez pathogène pour conférer, à coup sûr, après introduction par voie cérébrale, la maladie mortelle en série. En nous

mettant dans des conditions particulières, nous avons réussi à obtenir d'une même souche de virus des rues, deux virus fixes : l'un tuant le lapin inoculé dans le cerveau, en huit à dix jours,













| No. des lapins | Lignée | Numero du passage | Corps de Negri pour 100 neurones de la corne d'Ammon. | | Corps de Negri pour 100 neurones du noyau optique basal. | | Lapin mort en.... jours |
|----------------|--------|-------------------|---|--------|---|--------|-------------------------|
| | | | Aspect | Nombre | Aspect | Nombre | |
| 806 R | B | 19 ^e | o o | 3 |  | 122 | 11 j. |
| 825 R | B | 21 ^e | oo | 11 |  | 107 | 10 j. |
| 894 R | B | 25 ^e | oo | 6 |  | 176 | 10 j. |
| 809 R | C | 26 ^e | oo | 7 |  | 116 | 8 j. |
| 984 R | B | 29 ^e | oo | 5 |  | 69 | 10 j. |
| 851 R | C | 30 ^e | oo | 8 |  | 101 | 7 j. |
| 859 R | C | 31 ^e | oo | 12 |  | 124 | 8 j. |
| 887 R | C | 33 ^e | oo | 11 |  | 63 | 6 j. |
| 888 R | D | 33 ^e | oo | 24 |  | 123 | 6 j. |
| 898 R | D | 34 ^e | oo | 9 |  | 172 | 9 j. |
| 981 R | C | 39 ^e | oo | 6 |  | 87 | 9 j. |
| 988 R | C | 40 ^e | oo | 3 |  | 47 | 9 j. |

FIG. 9. — Tableau montrant le manque de parallélisme dans la diminution du nombre et des dimensions des corps de Negri dans la corne d'Ammon et dans le ganglion optique basal.

l'autre en dix à douze jours. Les cerveaux des lapins morts de la maladie expérimentale conférée par voie sous-dure mérienne présentent des corps de Negri. Le nombre et la dimension de ces inclusions, au niveau de la corne d'Ammon et de l'écorce, n'est

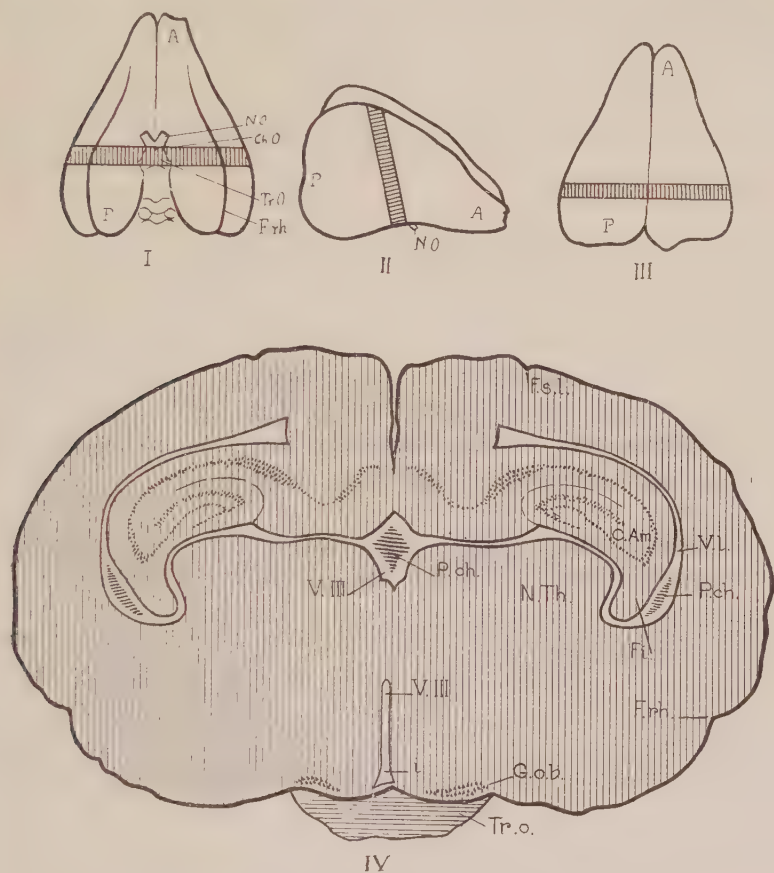


FIG. 40. — Schéma montrant la technique à suivre pour avoir sur les coupes d'encéphale le royaume optique basal.

Cerveau de lapin. — Les trois premiers schémas représentent la manière de faire les sections (zone hachurée) pour avoir sur la même coupe et la corne d'Ammon et le noyau optique basal. I, II et III : A., partie antérieure du cerveau; P., partie postérieure; N. O., nerf optique; Ch. O., chiasma optique; Tr. O., tractus optique; F. rh., fissure rhinale. IV : coupe du cerveau au niveau de la zone hachurée dans les trois premiers schémas; F. s. l., fissure saggitale latérale; C. Am., corne d'Ammon; V. l., ventricule latéral; P. ch., plexus choroïde; V. III, troisième ventricule; N. Th., noyaux thalamiques; i, infundibulum; Tr. o., tractus optique; G. o. b., noyau optique basal.

pas en rapport avec la durée de l'incubation de la maladie; mais, au fur et à mesure des passages en série, les inclusions diminuent en taille et nombre. Au niveau du noyau optique basal, même après quarante passages cérébraux en ligne directe, et alors que le virus est fixé depuis longtemps, les corps de Negri restent nombreux, gros, et présentent la structure interne caractéristique. Ce fait n'est pas l'apanage de cette souche particulière, puisqu'il a été constaté antérieurement par Nicolau et Kopciowska à l'occasion de l'étude d'autres souches de virus rabiques.

Quelques propriétés du virus.

Les propriétés de notre virus d'Oulou-fato sont celles des virus rabiques. Selon qu'on s'adresse au germe initial, peu de temps après son isolement de l'organisme humain, ou au virus fixé sur le lapin, ses propriétés sont celles d'un virus des rues peu virulent, ou d'un virus fixe de virulence normale. Pour ces raisons, notre exposé sera bref dans ce chapitre.

A. Comme tout virus rabique, le germe étudié par nous est *invisible* (1) et *non cultivable* dans les milieux habituels.

B. CENTRIFUGATION. — La centrifugation très forte d'une émulsion de cerveau diluée au 1/25 (lapin mort le vingt-troisième jour après l'inoculation sous-dure-mérienne, et constituant le quatrième passage d'une lignée de passages cérébraux) pendant trente minutes, n'enlève pas au liquide superficiel ses propriétés pathogènes.

C. DILUTIONS. — La dilution des émulsions cérébrales virulentes de notre virus donne des résultats différents, selon qu'on s'adresse au virus des rues ou au virus adapté et fixé sur le lapin.

1° *Virus des rues*. — Le cerveau d'un lapin de passage — le quatrième dans sa série, mort le vingt-troisième jour après l'inoculation cérébrale — sert à faire une émulsion au 1/25

(1) Nous considérons les inclusions dans la rage comme une réaction de la cellule vis-à-vis du germe invisible.

dans de l'eau physiologique. On la centrifuge légèrement pour la débarrasser des grosses particules en suspension, et le liquide superficiel, considéré comme dilution au 1/25, sert à faire des dilutions progressives, toujours dans de l'eau physiologique. Plusieurs lapins inoculés sous la dure-mère avec ces dilutions ont fourni les résultats suivants : les dilutions au 1/100, au 1/250 et au 1/500 ont conféré aux animaux la rage mortelle; les dilutions au 1/1.000, au 1/2.000 et au 1/5.000 se sont montrées dépourvues de pouvoir pathogène. Ce *titre bas* (1/500) est pour nous une preuve de plus de la virulence atténuée de notre virus des rues.

2° *Virus fixe*. — Au dix-huitième passage sous-dure-mérien d'une lignée, la dilution de la substance cérébrale d'un lapin mort le huitième jour nous a fourni les résultats suivants : les émulsions diluées au 1/500, au 1/1.000, au 1/2.000, au 1/4.000 et au 1/8.000 se sont montrées virulentes; les dilutions au 1/10.000 et au 1/20.000, avirulentes.

Deux autres expériences, faites avec le virus fixé sur le lapin après un nombre beaucoup plus grand de passages, nous ont fourni des résultats encore plus intéressants. Les cerveaux qui ont servi à faire les émulsions provenaient : le premier, du lapin 988R (le quarantième passage de la lignée C), le deuxième, du lapin 987R (le quarantième passage de la lignée D). Le germe rendu très virulent par passages répétés sur lapins tuait les animaux inoculés dans le cerveau en huit à neuf jours. Les dilutions faites d'après la même technique que pour le virus des rues, mais poussées jusqu'à 1/4.000, 1/8.000, 1/10.000, 1/12.000, 1/16.000 et 1/20.000, ont été inoculées également sous la dure-mère des lapins. Nous avons constaté que même la dernière dilution (1/20.000) s'est montrée virulente dans les deux expériences.

D. FILTRATION. — Plusieurs expériences de filtration, faites à travers des bougies L1 et L3, à l'aide du virus des rues et du virus fixe, ont donné des résultats négatifs.

E. ACTION DE LA GLYCÉRINE. — La glycérine pure, à la température de la glacière, supprime assez vite la virulence des germes des rues (trois à quatre semaines). Parfois, ce même

virus perd *en partie seulement* ses propriétés pathogènes au contact de la glycérine, à la glacière, au bout de quatorze jours.

Voici le résumé d'une expérience qui montre cette perte partielle de la virulence de notre souche de virus des rues, tout en mettant en évidence la sensibilité différente des espèces animales utilisées :

Un fragment du cerveau du lapin 657R (mort le dix-huitième jour après l'inoculation cérébrale ; 4^e animal d'une lignée de passages cérébraux) est conservé à la glacière dans de la glycérine pendant quatorze jours. A ce moment, on en fait une émulsion dans de l'eau physiologique, qu'on inocule à plusieurs espèces animales avec les résultats suivants :

1^o *Chien 21*, poids, 6 kilogr. 500 ; inoculé dans le cerveau. Résultat négatif.

2^o *Coq 9*, inoculé dans le cerveau ; sacrifié le cinquante-cinquième jour, sans avoir présenté à aucun moment des symptômes morbides ; examen histologique du névraxe et passage dans le cerveau d'un lapin, négatifs.

3^o *Rats 81 et 82*, inoculés dans le cerveau. Résultats négatifs.

4^o *Souris 43, 44 et 45*, inoculées sous la peau ; résultats négatifs.

5^o *Lapins 680R et 681R*, inoculés dans le cerveau. Sans avoir présenté aucun symptôme, le lapin 681R est sacrifié le cinquante-septième jour ; examen histologique du névraxe et passage dans le cerveau d'un lapin, négatifs. Le lapin 680R, amaigri, mais n'ayant pas présenté de troubles nerveux, est sacrifié le vingt-sixième jour. Modifications histologiques *minimes* dans l'encéphale et dans la moelle, mais *présence de très gros corps de Negri* tant dans les cornes antérieures et postérieures de la moelle que dans l'encéphale au niveau de la corne d'Ammon, de l'écorce et du noyau optique basal. Lésions intenses destructives et dégénératives dans les ganglions spinaux, où l'on trouve aussi des corps de Negri. *Un passage, fait en partant du cerveau de cet animal, dans le cerveau d'un lapin neuf, occasionne une rage typique mortelle en seize jours.*

6^o *Cobayes 4, 5 et 6*, inoculés dans le cerveau. *Les deux premiers meurent de rage* (confirmation histologique), le troi-

sième survit. En parfait état de santé, on sacrifie ce troisième cobaye au bout de cinquante-sept jours. Absence de lésions du névraxe, absence de virus rabique (1).

Deux conclusions se dégagent de cette expérience :

a) *La glycérine atténue assez vite (quatorze jours) le germe de la maladie d'Oulo-fato à l'état de virus des rues* ;

b) *Le cobaye et le lapin sont plus sensibles à l'action pathogène de notre virus, que le rat, la souris, le chien et le coq.*

Le virus fixé sur les lapins est de beaucoup plus résistant à l'action atténuante de la glycérine. Nous avons trouvé virulents des fragments de cerveau de lapins de passage, conservés dans ces conditions pendant plusieurs mois (2) [trois à quatre mois].

F. ELECTROPHORÈSE. — A l'exemple du virus rabique classique (3) et des autres ultra-virus neurotropes (4), nous avons soumis le germe de la maladie du chien fou à l'électrophorèse. Les particules qui lui servent de support dans des émulsions cérébrales virulentes à pH 7,2, se dirigent sous l'influence du courant électrique vers le pôle positif de l'appareil. Elles sont donc électro-négatives [Appareil de Todd modifié par Nicolau (5)].

Expérimentation sur les animaux.

A. LAPIN. — La symptomatologie de la maladie présentée par les lapins inoculés avec notre souche d'Oulou-fato diffère selon qu'on s'adresse au virus primitif (des rues) ou au virus fixé. Chez les animaux infectés par voie sous-dure-mérienne avec le *virus des rues*, on constate la présence presque constante de deux symptômes qui font défaut pendant la maladie

(1) Dans le cerveau de cet animal, l'un de nous a trouvé un parasite que l'étude a permis d'assimiler provisoirement aux toxoplasmoses (NICOLAU. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **110**, 1932, p. 676 et 763).

(2) Dans notre glacière électrique et dans de la glycérine pure, nous avons pu conserver des souches de virus rabique pendant plus d'un an (NICOLAU et KOPCIEWSKA. *C. R. de la Soc. Biol.*, **104**, 1930, p. 1139).

(3) NICOLAU et KOPCIEWSKA. *C. R. de la Soc. Biol.*, **104**, 1920, p. 1142.

(4) NICOLAU et KOPCIEWSKA. *C. R. de la Soc. Biol.*, **104**, 1930, p. 1136; **108**, 1931, p. 364.

(5) NICOLAU et KOPCIEWSKA. *C. R. de la Soc. Biol.*, **104**, 1930, p. 290.

conférée par le virus fixe : il s'agit d'une période d'excitation qui précède de quelques jours la phase paralytique, et de phénomènes de contracture localisée ou généralisée, pouvant donner à l'animal la rigidité d'un morceau de bois. Pendant la phase d'excitation, l'animal sorti de sa cage se met à courir avec de grands bonds; durant sa course désordonnée, il butte contre les obstacles. Chez certains lapins infectés avec ce même virus des rues, nous avons constaté des automutilations au niveau des extrémités, des grincements de dents, de la sialorrhée, des convulsions épileptiformes. Presque toujours, la parésie des muscles lombaires précède celle du train postérieur. La tétraplégie s'ensuit, et la mort survient deux, trois ou quatre jours plus tard. La maladie peut durer de trois à six jours, exceptionnellement jusqu'à onze jours.

Par contre, le virus, une fois fixé, confère une rage paralytique pure, type de rage mue, de courte durée : l'animal montre les premiers symptômes d'incoordination motrice et de parésie, vingt-quatre à quarante-huit heures avant la mort; d'habitude, l'état de paralysie ne dure pas plus de vingt-quatre heures.

La caractéristique la plus importante de ce virus des rues africain est sa *faible action pathogène*. Inoculé sur la peau épilée, rasée et scarifiée, il tue seulement 2 sur 3 lapins infectés; et sur ces 2 lapins morts de rage (contrôle histologique positif), *un seul renferme le virus* dans le cerveau, la neuro-infection s'étant autostérilisée dans l'autre animal.

Introduit dans le testicule, il se montre dépourvu d'action pathogène (trois inoculations négatives).

Par voie *intramusculaire*, sous forme d'injection de 2 cent. cubes d'émulsion dans les muscles de la nuque, ce virus tue, très tardivement, 2 lapins sur 3 (en quatre-vingt-sept et quatre-vingt-douze jours).

L'inoculation de quelques gouttes dans la *chambre postérieure de l'œil* donne la mort à 2 lapins sur 4.

Le badigeonnage de la *cornée scarifiée* avec une émulsion cérébrale épaisse virulente engendre la maladie mortelle en vingt et dix-neuf jours.

L'injection *intraveineuse* (4 cent. cubes d'émulsion) tue de même en trente-six et trente-huit jours.

L'inoculation *intrasciatique* confère la mort des lapins en vingt, vingt et un et vingt-sept jours.

Septinévrite. — On sait que dans la rage des rues d'Europe conférée au lapin, la septinévrite (1) est constante (2). Il n'y a que le virus fixé sur cette espèce animale qui paraît avoir perdu en partie la propriété de progression centrifuge le long des nerfs, ainsi que l'ont montré précédemment Nicolau et Serbanesco (3). La dissémination centrifuge de notre virus des rues dans le système nerveux périphérique, après inoculation sous-dure-mérienne, se fait d'une manière inconstante, voire même exceptionnelle. Mais, tandis que, dans le cas du virus fixe, la carence dans la production du phénomène de septinévrite est due à l'adaptation prolongée et accentuée des germes pour le névraxe, dans le cas de notre virus d'Oulou-fato des rues, cette carence est provoquée par la faible virulence des germes. Ce fait est mis en évidence par la constatation que la dilution au delà de 1/500 leur enlève l'activité pathogène. Nous avons fait plusieurs expériences pour étudier la septinévrite occasionnée par notre virus des rues dans l'organisme du lapin.

Dans deux expériences, des émulsions de nerfs périphériques (sciatique, brachial) provenant de deux lapins morts respectivement le vingt-troisième et le dix-neuvième jour après l'inoculation cérébrale ont été introduites dans le cerveau de plusieurs lapins (avec l'émulsion de chaque nerf, on inoculait deux lapins). Tous ces lapins ont survécu sans montrer de symptômes morbides. Dans ces deux expériences, le névraxe des animaux sur lesquels on avait prélevé les nerfs était bien virulent, puisque des inoculations cérébrales aux lapins l'avaient prouvé, mais leurs nerfs périphériques se sont montrés dépourvus de germes.

Dans une autre expérience, malgré la virulence du cerveau et de la moelle d'un lapin mort vingt-deux jours après l'inoculation cérébrale, les nerfs brachiaux se sont montrés dépourvus de virus, tandis que l'émulsion de sciatiques a tué un lapin sur deux inoculés par voie sous-dure-mérienne.

Enfin, dans une dernière expérience, nous avons trouvé une

(1) NICOLAU, DIMANESCO et GALLOWAY. *Ces Annales*, 43, 1929, p. 1-88.

(2) NICOLAU et GALLOWAY. *C. R. de la Soc. Biol.*, 98, 1928, p. 31; NICOLAU et MATEESCO. *C. R. de l'Acad. Sc.*, 186, 1928, p. 1072.

(3) NICOLAU et Virg. SERBANESCO. *C. R. de la Soc. Biol.*, 99, 1928, p. 294.

faible virulence des nerfs brachiaux, et une virulence nulle des sciatiques.

Ces résultats ajoutés à ceux relatés précédemment quant à l'action des dilutions et de la glycérine sur la virulence de notre souche, ainsi qu'aux cas d'autostérilisation du virus dans l'organisme du lapin, montrent bien que la souche d'Oulou-fato en notre possession avait au début des expériences, alors qu'elle se trouvait à l'état de virus des rues, une faible virulence.

Distribution des germes dans l'organisme des lapins après inoculation intracérébrale du virus des rues. — Cette distribution étant fonction de la virulence des germes et du phénomène de septinévrite s'est montrée, dans nos expériences, différente de celle du virus des rues classique : introduit sous la dure-mère, notre virus des rues est retrouvé après la mort de l'animal dans le cerveau et dans la moelle seulement. Exceptionnellement, il peut être mis en évidence dans les gros troncs nerveux (brachial et sciatique; voir septinévrite). A l'aide des inoculations, on ne peut le trouver ni dans les glandes salivaires, ni dans les capsules surrénales, ni dans le pancréas, ni dans la rate, ni dans le foie, ni dans les reins, ni dans les testicules, ni dans la moelle osseuse. Recherché plusieurs fois dans le sang des animaux agoniques ou *post mortem*, il y faisait régulièrement défaut.

En réalité, nous pensons que le virus doit exister au niveau des filets nerveux périphériques, dans les plexus nerveux ainsi que dans les microganglions nerveux intraviscéraux, *mais en très petite quantité*; comme les petites quantités de ce germe n'ont plus d'action pathogène (voir dilutions), on ne peut pas les mettre en évidence par l'inoculation d'émulsions de nerfs ou d'organes dans l'encéphale d'animaux neufs. Cette interprétation se trouve vérifiée d'ailleurs par certaines constatations histologiques que nous relaterons plus loin.

B. ACTION PATHOGÈNE DU VIRUS D'OULOULOU-FATO SUR DIVERSES ESPÈCES ANIMALES. — Le virus des rues inoculé dans l'encéphale du *singe* (*Macacus rhesus*) confère une rage mortelle. L'animal présente les premiers symptômes d'incoordination dix-sept jours après l'infection. On constate plus tard de la mastication à vide, de la sialorrhée intense, des parésies, des paralysies.

La mort survient deux à quatre jours plus tard. Il nous a été donné de constater de l'automutilation : un animal, seul dans sa cage, s'est fait pendant sa maladie des morsures profondes et multiples aux extrémités des membres antérieurs et de l'avant-bras.

Le même virus des rues, inoculé dans l'encéphale, tue les *cobayes* en onze à quatorze jours, les *rats* en onze à quatorze jours également, les *souris* en neuf à onze jours; introduit sous la peau de cette dernière espèce animale, il reste parfois sans effet.

Le virus fixé sur lapins, introduit par voie sous-durémérienne, tue les *chiens* en huit jours, les *cobayes* en six à huit jours, les *rats* en dix à douze jours, les *poules* entre vingt-cinq et trente jours; des souris inoculées sous la peau peuvent ou échapper à la maladie et survivre, ou mourir de rage en quinze à dix-huit jours.

Anatomie pathologique.

ASPECT MACROSCOPIQUE. — L'aspect macroscopique des organes d'animaux morts à la suite d'inoculation de notre virus est celui de la rage classique, avec cette différence que, parfois chez les lapins, la rate est légèrement augmentée de volume. L'estomac, chez certains animaux, présente parfois les lésions lenticulaires que l'un de nous a décrites par ailleurs avec Galloway (1) dans l'encéphalo-myélite enzootique expérimentale; mais ces altérations dues à l'autodigestion prennent naissance *post mortem* et se rencontrent dans d'autres maladies que celle du chien fou.

ASPECT MICROSCOPIQUE. — Les altérations microscopiques du névraxe d'animaux morts de notre rage africaine sont celles de la rage classique. Le seul point de différence est constitué par l'aspect des inclusions cytoplasmiques que nous avons étudié chez les espèces animales suivantes : lapin, singe, chien, rat, souris, cobaye et poule.

(1) NICOLAU et GALLOWAY, Borna disease, etc... His Majesty's Stationery Office, Londres, 1928.



FIG. 11. — Lapin 530R. Corps de Negri dans une formation nerveuse ganglionnaire siégeant dans le hile de la capsule surrénale; c, corps de Negri. Coloration Mann, gross. : 600.

Lapin. — Les lapins morts à la suite de l'infection conférée par voie cérébrale présentent dans le système nerveux des lésions rabiques. Il est donc inutile de donner la description de ces lésions. Le seul point particulier dans les modifications histologiques est constitué par l'aspect des corps de Negri. Qu'on les considère au niveau de la corne d'Ammon, de l'écorce, des cornes postérieures de la moelle, ou des neurones des ganglions spinaux, les inclusions décelées dans le système

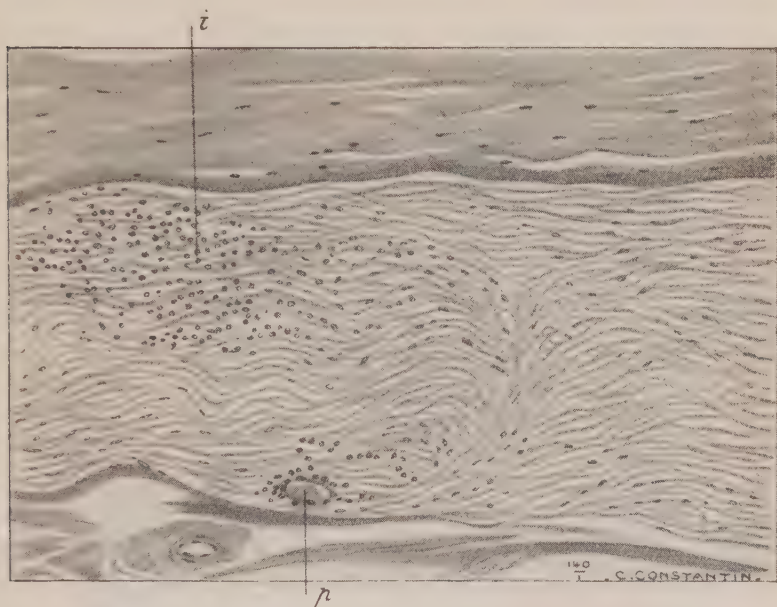


FIG. 42. — Lapin 322R. Pneumogastrique; *i*, infiltration interstitielle à éléments mononucléaires; *p*, processus de périvascularite. Coloration Toluidine-Eosine, gross. : 140.

nerveux des lapins infectés expérimentalement avec le virus rabique d'Oulou-fato sont différentes quant à leur affinité tinctoriale des corps de Negri classiques. Si l'on plonge dans le même bain de colorant de Mann (éosine-bleu de méthyle) des coupes de cerveau de lapin mort de la maladie du chien fou et des coupes de cerveau d'animal mort de rage des rues classique d'Europe, ces dernières montrent — après la différenciation spéciale — des corps de Negri très rouges, brillants, tandis que les inclusions trouvées dans les premières

apparaissent presque toutes colorées en bleu, ou bleu-gris (V. fig. 1, pl. XIII). Tout à fait exceptionnellement et vers la base du cerveau (notamment au niveau du noyau optique basal), on rencontre de rares inclusions teintées en rouge. *D'une manière générale, nous pouvons affirmer que les corps de Negri chez les lapins inoculés avec notre souche de virus d'Oulou-fato ne se colorent pas en rouge avec la méthode de Mann* (plus de 100 cas examinés). Avec le procédé de Giemsa prolongé, avec la toluidine-éosine, avec la méthode safran-bleu polychrome d'Unna, ces inclusions sont identiques à celles de la rage classique. Les corps de Negri de notre rage

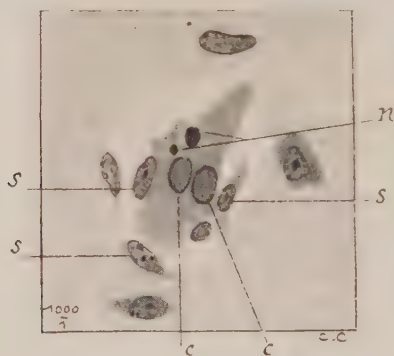


FIG. 13. — Lapin 423 R. Neurone de la corne d'Ammon, en voie de dégénérescence, renfermant dans le cytoplasme deux corps de Negri; *n*, noyau ayant perdu le contour, réduit à deux masses de chromatine oxyphile; *c*, corps de Negri; *s*, cellules satellites. Coloration Giemsa, gross. : 1.000.

spéciale gardent la propriété de ne pas prendre l'éosine dans le bain de colorant de Mann, même après la transformation du virus des rues en virus fixe. Sur certaines coupes de l'encéphale colorées au Mann, nous avons réussi à distinguer parfois de tout petits corpuscules rouges, intra ou extra-cytoplasmiques, dont la dimension dépassait à peine la limite de la visibilité; il s'agissait probablement des corpuscules décrits dans la rage par J. Koch.

Des corps de Negri colorés toujours en bleu (Mann) ont été trouvés dans les cellules de Purkinje du cervelet, dans les neurones des microganglions siégeant dans le hile des capsules surrénales (fig. 11), dans le ganglion plexiforme, dans les for-

mations nerveuses intra-pancréatiques, dans les neurones intra-parotidiens, et partout où des neurones ont été mis en évidence au niveau des plexus nerveux et dans les viscères.

Ajoutons que les racines nerveuses, au niveau des ganglions

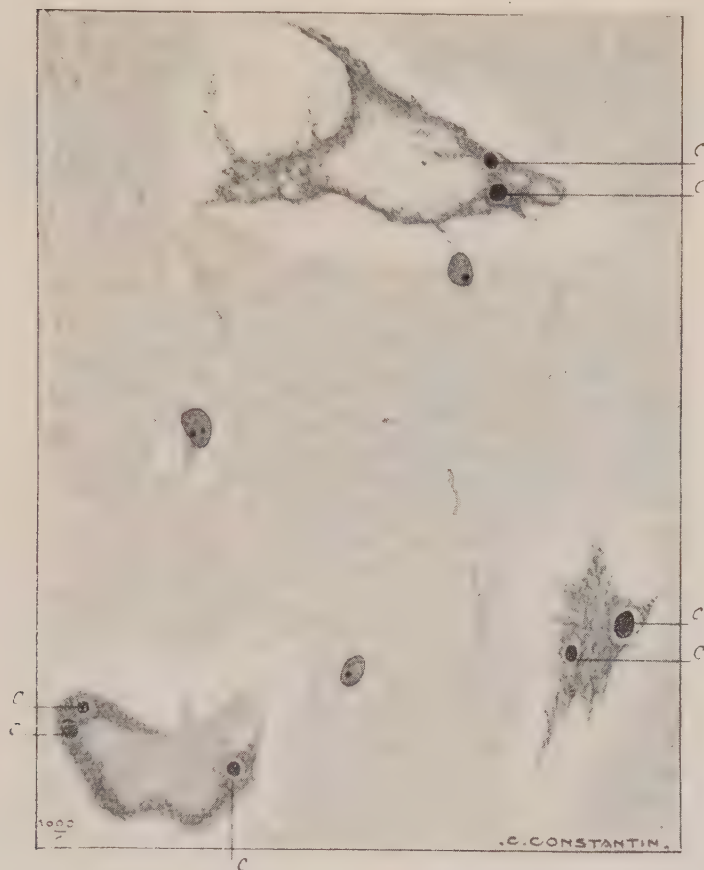


FIG. 14. — Lapin 431R. Trois neurones dégénérés du bulbe, renfermant des corps de Negri; c, corps de Negri. Coloration Giemsa, gross. : 1.000.

spinaux, et certains nerfs (pneumogastrique, splanchnique, filets nerveux intra-pancréatiques ou intra-cardiaques) ont montré souvent sur nos coupes des processus intenses de névrite interstitielle infiltrative, descendante (fig. 12). La présence des inclusions au niveau des neurones intraviscéraux, ainsi

que les figures de névrite interstitielle au niveau de certains troncs et filets nerveux, nous oblige à conclure que notre virus d'Oulou-fato, à l'exemple des virus des rues d'Europe,

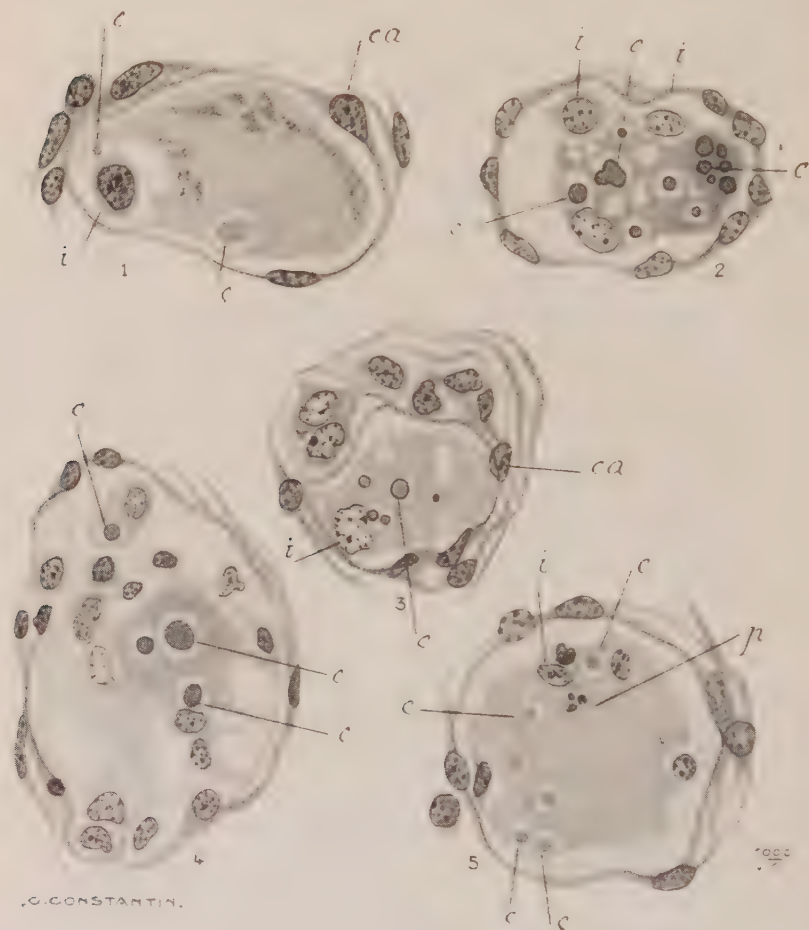


FIG. 15. — Lapin 432R (1, 2, 3) et lapin 562R (4 et 5); cellules nerveuses des ganglions spinaux, en état avancé de destruction, renfermant de nombreux corps de Negri; c, corps de Negri; i, cellules d'infiltration pénétrant dans le cytoplasme des neurones dont l'état de nécrobiose est manifeste; ca, cellules capsulaires; p, polynucléaire pénétré dans le protoplasme du neurone. Coloration Giemsa, gross. : : 4.000.

produit dans l'organisme du lapin inoculé sous la dure-mère une septinévrite caractéristique. L'impossibilité de mettre en

évidence le virus dans les organes et parfois dans les nerfs, par inoculation de ces tissus dans le cerveau des lapins, est due à la faible virulence des germes dont la présence est attestée par les inclusions et par les lésions qu'ils engendrent sur place.

Quel que soit l'endroit où l'on étudie les corps de Negri dans l'organisme du lapin infecté avec notre virus des rues, on trouve ces corps présentant des dimensions très fortes; il nous a été donné d'en trouver dont le diamètre le plus grand dépassait 12 μ . A l'intérieur de ces beaux corps, on constate la présence des plages chromatiques caractéristiques.

Ajoutons encore un fait d'observation : on affirme cou-

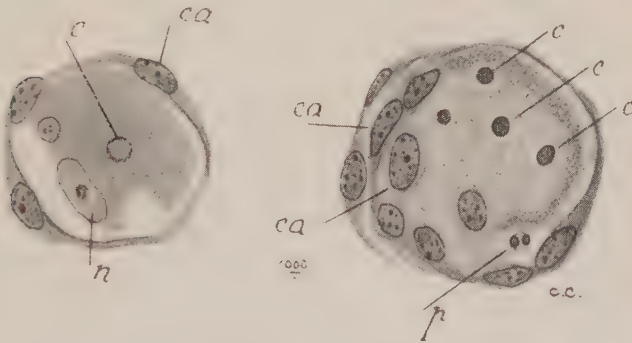


FIG. 16. — Lapin 522R, deux neurones du ganglion plexiforme, renfermant des corps de Negri; le neurone de droite, en état de dégénérescence oxyphile, est envahi par des cellules capsulaires (ca); p, polynucléaire pénétré dans le neurone; c, corps de Negri; n, noyau du neurone. Coloration Toluidine-Eosine, gross. : 1.000.

ramment que, dans la rage, les corps de Negri existent seulement dans le cytoplasme des cellules dont l'intégrité morphologique et tinctoriale est respectée; en d'autres termes, les inclusions de la rage n'existeraient jamais à l'intérieur des cellules plus ou moins dégénérées, altérées. Certains auteurs ont puisé même dans cette constatation des arguments qui tendent à prouver que le corps de Negri serait constitué par une ou plusieurs colonies de parasites ne pouvant se développer qu'à l'intérieur des cellules intactes. Dans nos préparations, nous avons trouvé souvent des cellules en état avancé de dégénérescence, contenant des corps de Negri

(v. fig. 13, 14, 15 et 16). Ce fait est-il une particularité de notre souche ? Nous ne le croyons pas. Et l'argument tiré par ceux qui interprètent l'inclusion non pas comme une réaction de la cellule vis-à-vis du germe (constituée à l'exemple « d'une perle »), mais comme le parasite lui-même développé en condition

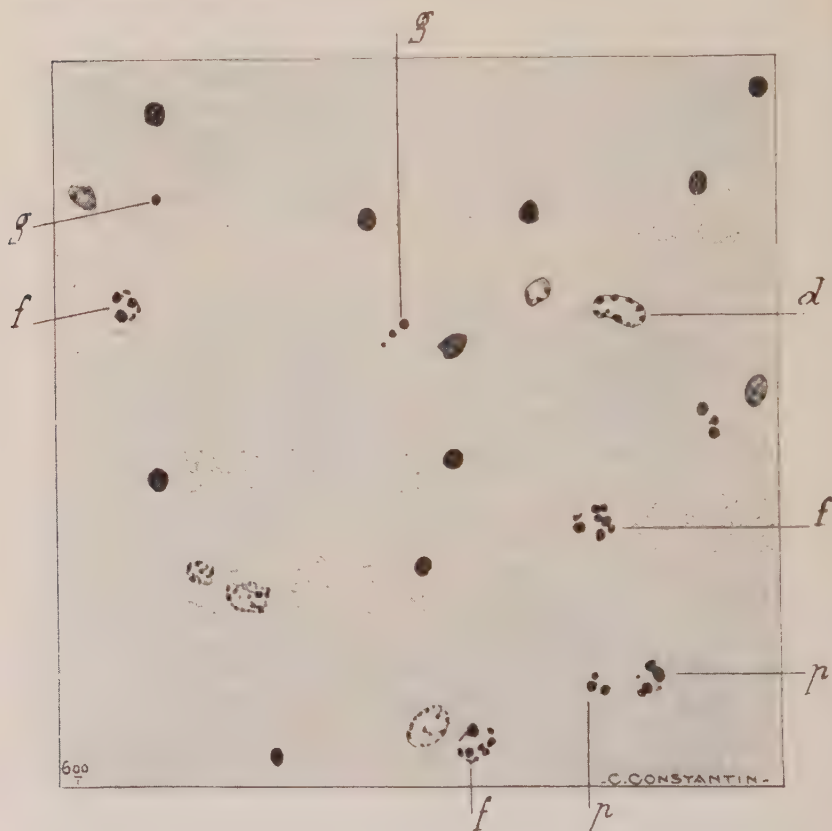


FIG. 17. — Lapin 530R, lobe piriforme de l'encéphale; karyolyse des cellules gliales; *d*, début de dégénérescence; *f*, formes constituées par des amas de fragments de chromatine oxyphile, dégénérée; *p*, formes de dégénérescence simulant les polynucléaires; *g*, grains libres de chromatine oxyphile, dans le parenchyme cérébral. Coloration Mann, gross : 600.

optima dans le cytoplasme du neurone non altéré, perd de sa valeur devant nos constatations. (V. fig. 13, 14, 15 et 16, pl. XII.)

Ajoutons encore le fait suivant : au niveau de l'écorce, ainsi que dans le lobe piriforme, chez les lapins morts de la maladie

conférée par le virus des rues, on constate souvent la présence d'une altération spéciale des cellules gliales; la chromatine se raréfie à l'intérieur du noyau, se condense en quelques blocs à

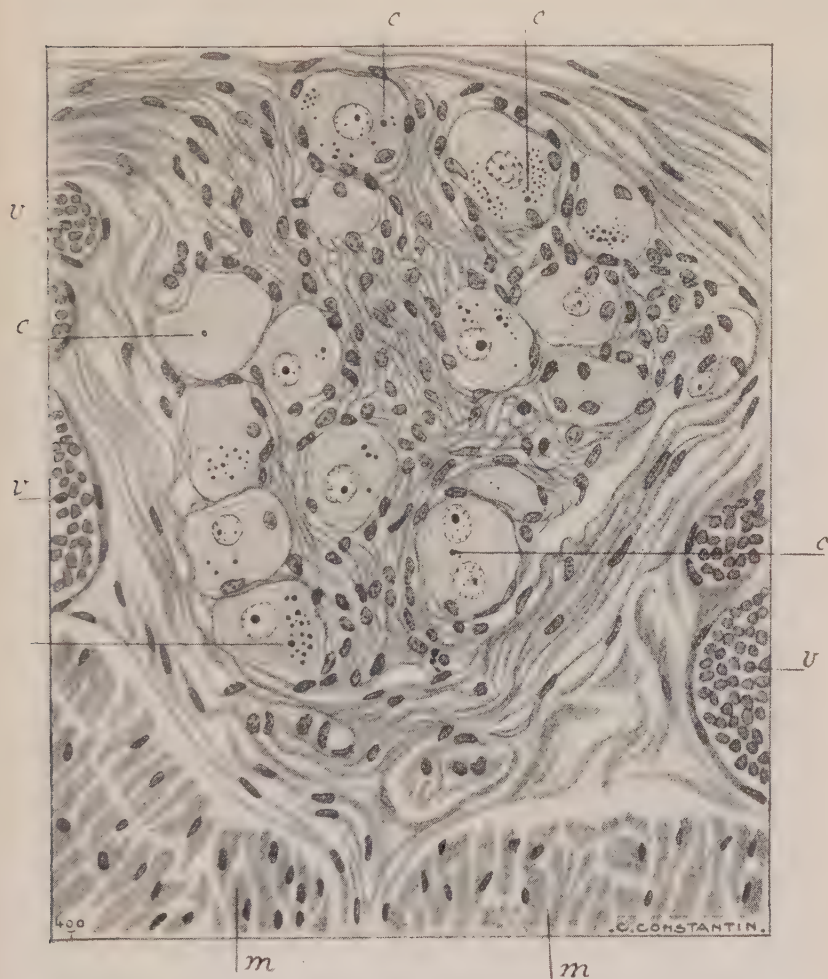


Fig. 18. — Singe. Microganglion nerveux dans le muscle cardiaque, Corps de Negri (c) et granulations oxyphiles dans le cytoplasme des neurones; v, vaisseaux; m, muscle cardiaque. Coloration Mann, gross. : 400.

affinité tinctoriale plus ou moins oxyphile. Ces blocs restent accolés d'abord à la membrane nucléaire; ensuite, disposés de manière irrégulière, au nombre de 3, 4, ou plus, ils

donnent à la cellule dégénérée l'aspect d'un polynucléaire. Après la pycnose nucléaire de l'élément glial, on trouve des fragments libres de chromatine plus ou moins oxyphile dans le parenchyme cérébral. Sur certaines préparations, on assiste à



FIG. 19. — Singe, formation nerveuse dans le parenchyme pancréatique; c, corps de Negri coloré en bleu (Mann); n, neurone renfermant des granulations oxyphiles; i, cellules d'infiltration; p, parenchyme glandulaire. Coloration Mann, gross. : 700.

tous les stades de cette dégénérescence spéciale de l'élément glial; la figure 17 en montre quelques aspects.

Singe. — Les lésions du névraxe des singes inoculés dans le cerveau avec notre souche de virus des rues sont celles de la

rage classique. On trouve en plus des lésions de névrite interstitielle descendante des filets nerveux et des lésions infiltra-



FIG. 20. — Singe, filet nerveux avec trois neurones dans son trajet intrapancréatique; *f*, filet nerveux; *n*, neurone dégénéré, avec un polynucléaire pénétré dans le cytoplasme; *i*, cellules mononucléaires d'infiltration interstitielle; *p*, parenchyme glandulaire pancréatique. Coloration Mann, gross. 500.

tives et dégénératives au niveau des formations nerveuses ganglionnaires intra-cardiaques (fig. 18), intra-pancréatiques

(fig. 19 et 20), intra-parotidiennes, intra-surrénales (fig. 21.) Présence de corps de Negri — colorés en bleu par le Mann — dans ces formations. Les inclusions intra-cytoplasmiques trouvées au niveau de l'encéphale ont été bien étudiées surtout

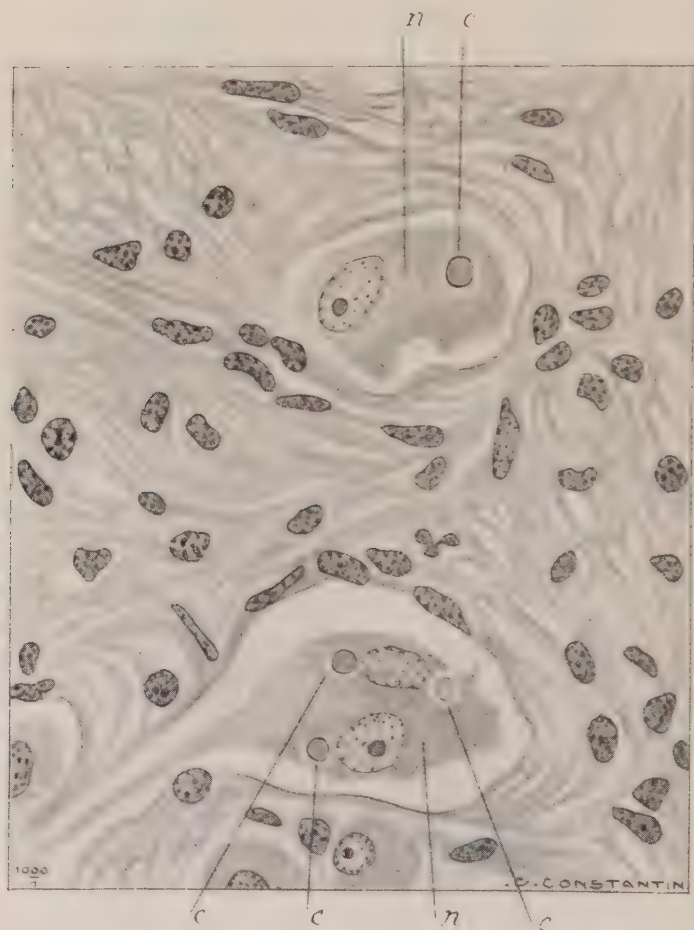


FIG. 21. — Singe, microganglion nerveux accolé à la paroi de la capsule surrénale; n, neurone renfermant dans le cytoplasme des corps de Negri colorés en bleu (Mann); c, corps de Negri. Coloration Mann, gross. : 4.000.

chez le singe n° 3 (*Macacus rhesus*, v. page 790.) Des coupes de cerveau ont été faites à plusieurs niveaux : écorce frontale, pariétale, occipitale, corne d'Ammon, mésocéphale,

noyaux centraux; on a fait aussi des coupes du bulbe, du cer-
velet et de la moelle à plusieurs niveaux de la région cervicale,
dorsale et lombaire.

Décrivons d'une manière brève les altérations particulières
trouvées en ces endroits. D'abord, un aspect curieux de cer-
taines cellules gliales : dans plusieurs régions (écorce à tous

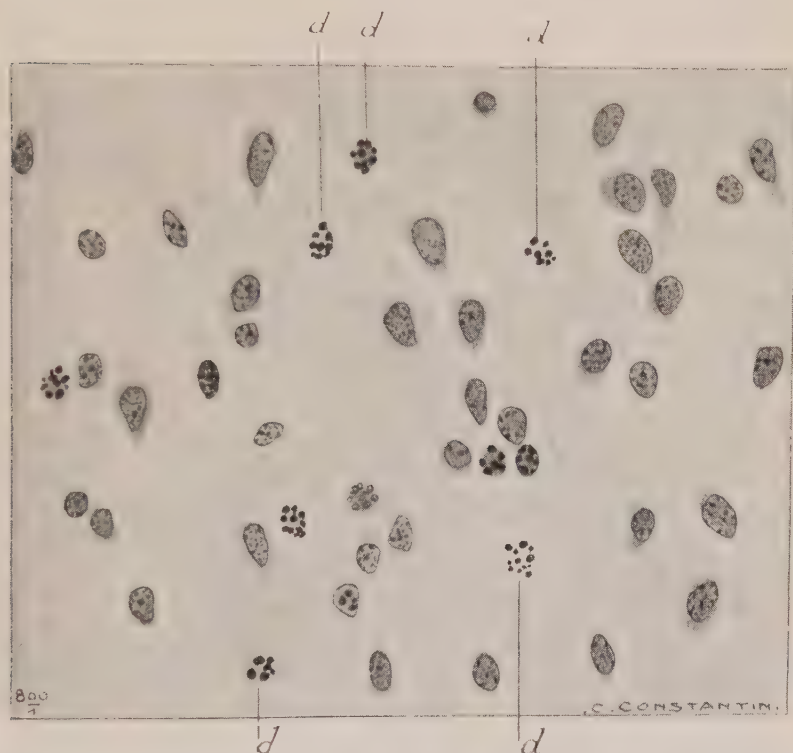


FIG. 22. — Singe, écorce frontale; dégénérescence pycnotique des cellules
gliales; *d*, divers stades de karyolyse. Coloration Mann, gross. : 800.

les niveaux, noyaux centraux, cervelet), on rencontre un très
grand nombre de ces cellules en état de karyolyse. Ce proces-
sus plus avancé met les cellules lésées en état de pycnose; les
grains de chromatine dégénérée deviennent oxyphiles et se
trouvent éparpillés dans le parenchyme (fig. 22); ces altéra-
tions se trouvent en plus des lésions constatées habituellement
dans la rage des rues conférée au singe (processus de périvas-

cularite, lésions infiltratives diffuses ou nodulaires, méningite, dégénérescence des neurones, etc.). Voici maintenant l'aspect des inclusions intra-cytoplasmiques :

Ecorce frontale : rares corps de Negri. Le dénombrement de ces corps dans 100 neurones donne, pour cette région seulement, le nombre de 3. Les inclusions sont de taille moyenne et apparaissent en bleu sur les préparations colorées au Mann.

Ecorce pariétale : Les corps de Negri sont très abondants à ce niveau. On en trouve dans presque chaque cellule nerveuse (98 p. 100). Dans les préparations colorées au Mann, ils apparaissent presque toujours en bleu-gris, rarement en bleu-violacé ; 5 p. 100 de ces corps seulement sont colorés en rouge comme les corps de Negri classiques. Les inclusions présentent un polymorphisme très accentué : tantôt de gros corps mesurant 6, 8 à 10 μ avec points chromatiques à l'intérieur, tantôt des petites inclusions ressemblant à celles signalées par Manouélian, ou encore des formations plus ou moins oxyphiles et d'aspect bacillaire, cocciforme, ou même des filaments longs, irréguliers, enchevêtrés.

Ecorce occipitale. — Les inclusions, en cet endroit, présentent le même polymorphisme que dans l'écorce pariétale. Sur 100 neurones, nous avons trouvé 71 cellules à inclusions : 6 p. 100 de ces cellules contenaient des corps de Negri rouges (coloration au Mann), typiques ; 33 p. 100 renfermaient des corps de Negri bleus, dépourvus d'affinité oxyphile, et 36 p. 100 étaient remplies de corpuscules plus ou moins oxyphiles, en forme de bâtonnets, de filaments ou de cocci (fig. 2, pl. XIII).

Dans la *corne d'Ammon*, sur 100 neurones comptés, 19 étaient dépourvus d'inclusions : 13 renfermaient une poussière oxyphile ou des formations cocciformes, bacilliformes, etc. ; dans 68 autres neurones on trouvait un total de 85 corps de Negri, dont 64 colorés en bleu et 21 en rouge (Mann). Ajoutons que certaines cellules contenaient à la fois, à côté des inclusions oxyphiles, de grosses inclusions colorées en bleu (fig. 3, pl. XIII).

Mêmes constatations pour les inclusions décelées dans les *noyaux centraux*, le *mésocéphale*, le *bulbe* et le *cervelet*. Dans cette dernière région, ainsi que dans certains points du bulbe, on trouve des cellules nerveuses en état avancé de dégénérescence, renfermant des corps de Negri.

Chien. — Chez le chien mort de la maladie conférée par voie sous-dure-mérienne, on rencontre dans le névraxe les lésions habituelles de la rage. Les inclusions cytoplasmiques de l'encéphale ou du cervelet (fig. 23) sont semblables à celles mentionnées chez le singe. De plus, nous avons rencontré un aspect d'inclusions qui mérite d'être signalé. Dans certains neurones de la corne d'Ammon, on trouve de véritables amas de formations bacilliformes ou cocciformes qui occupent une surface circulaire ou ovalaire bien délimitée à l'intérieur du cytoplasme; on dirait des sacs remplis de grains, sacs dont la paroi se colore

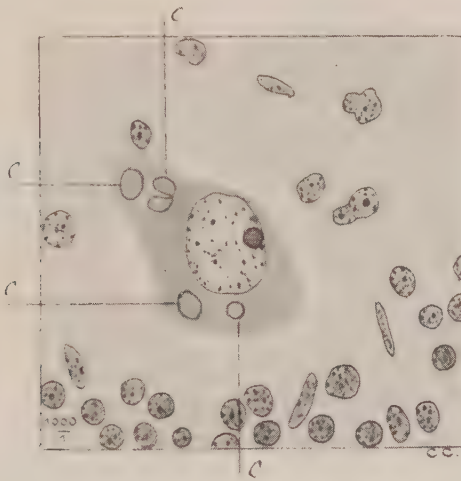


FIG. 23. — Chien, cervelet; cellule de Purkinje renfermant dans le protoplasme plusieurs corps de Negri (c) colorés de bleu. Coloration Mann, gross. : 1.000.

très peu ou parfois ne se colore plus du tout, et dont le contenu seul serait colorable, donc visible (fig. 4, pl. XIII). Le chien (1) qui nous a permis d'obtenir ces préparations est mort huit jours après l'inoculation. Faut-il croire que sa mort rapide a empêché la formation des corps de Negri et nous a permis ainsi de surprendre une des phases de constitution de ces corps? Peut-on interpréter ces aspects comme des amas de colonies de virus

(1) Nous avons rencontré, rarement, de telles formations chez le lapin. Les figures 7 et 8 de la planche finale montrent l'aspect de ces « sacs à grains » dans les neurones de la corne d'Ammon de cette espèce animale.

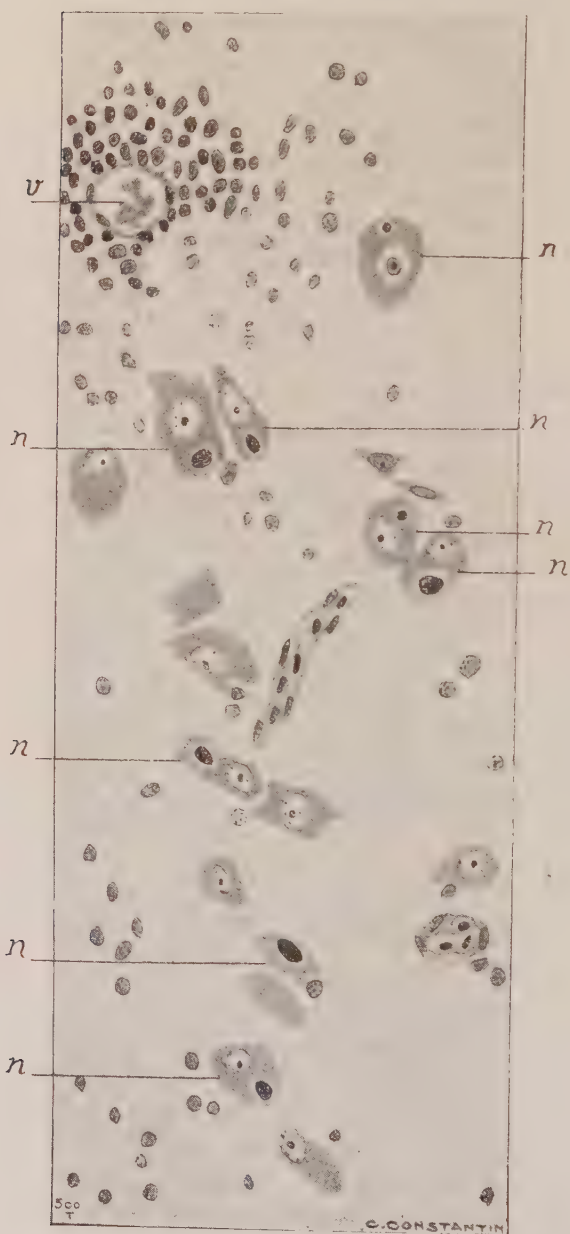


FIG. 24. — Poule; corne d'Ammon; *n*, neurones avec des corps de Negri dans le cytoplasme; *v*, vaisseau, processus de périvascularité. Coloration Giemsa, gross. : 500.

peu actif, dont le manque d'agressivité n'a pas incité suffisamment la cellule pour provoquer à son entour la sécrétion d'un manteau oxyphile qui exclut de la circulation les germes, les enrobe d'une substance isolatrice et les transforme ainsi en « perle »? Peut-on également faire un rapprochement entre la faible virulence de notre souche en général et le fait que les corps de Negri qu'elle engendre sont presque toujours dépourvus

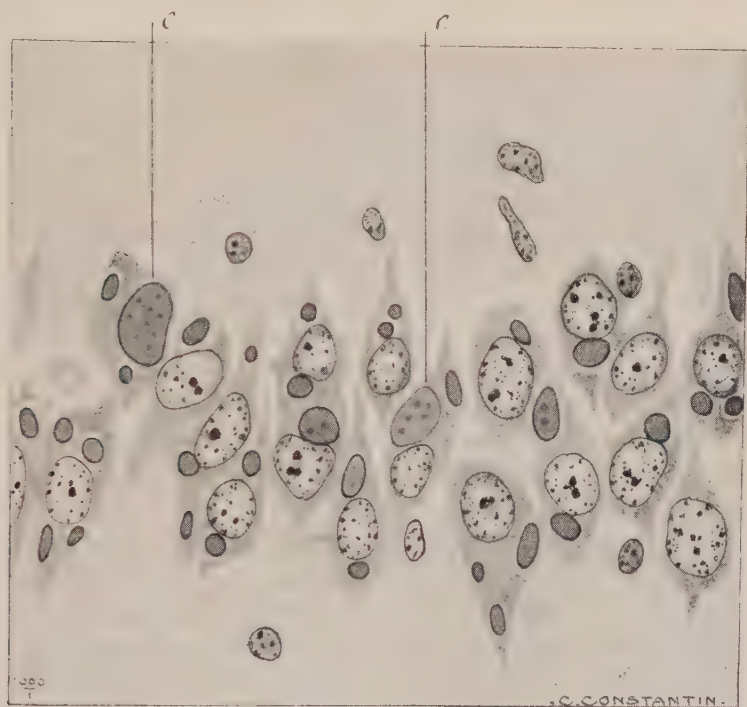


FIG. 25. — Cobaye, corne d'Ammon; très nombreux corps de Negri, dont quelques-uns très gros et à belle structure interne (c). Coloration Giemsa, gross. : 1.000.

d'affinité oxyphile? Nous n'en savons rien, et dans l'incertitude nous préférons ne pas faire d'hypothèses (voir fig. 5, 6, 9, 10, 11 et 12 de la planche XIII).

Chez la *poule*, nous avons trouvé de très beaux corps de Negri de dimensions très fortes et contenant des plages chromatiques (fig. 24). Une minime proportion de ces corps était oxyphile, la plupart se colorant en bleu par la méthode de Mann.

Enfin, chez les *cobayes*, les *rats* et les *souris*, les lésions provoquées par notre germe sont celles de la rage. Les corps de Negri, très abondants (fig. 23), sont presque toujours dépourvus d'affinité oxyphile (Mann). Chez ces trois espèces animales, on rencontre plus souvent que chez le lapin des formations intracytoplasmiques granulaires, pseudo-microbiennes, oxyphiles, au niveau de la corne d'Ammon et par ailleurs dans le système nerveux.

Immunité.

On sait qu'il est difficile de conférer aux lapins une immunité antirabique solide; en effet, il est exceptionnel de constater qu'un lapin, vacciné selon les méthodes courantes, puisse survivre à l'inoculation intracérébrale d'épreuve. Cette dernière voie d'inoculation étant trop sévère, on fait d'habitude l'inoculation d'épreuve dans la chambre antérieure de l'œil ou dans la chambre postérieure du même organe, et les animaux vaccinés préalablement ont plus de chance de survivre que les témoins. Dans le cas de l'inoculation d'épreuve par voie sous-dure-mérienne, les lapins vaccinés préalablement meurent en général un peu plus tard que les animaux neufs. Les résultats de ces techniques d'immunisation n'étant pas toujours très concluants, nous avons fait l'expérience d'immunité croisée entre le virus d'Oulou-fato et une souche de rage authentique, en utilisant des lapins fortement immunisés et *pouvant supporter l'injection d'épreuve par voie intracrânienne avec du virus homologue, sans montrer de symptôme morbide*. Nous arrivons à obtenir un tel état réfractaire solide chez certains de nos animaux, en les vaccinant selon la méthode que l'un de nous avec M^{me} Kopciowska a relatée précédemment (1).

Expérience. — Le lapin 331 N reçoit, en trois séances espacées l'une de l'autre de cinq jours, un total de 50 injections intradermiques renfermant un total de 6 cent. cubes d'un virus rabique classique des rues dilué au 1/20 et formolé à 2 p. 1.000. Dix jours après la dernière série d'injections intradermiques, l'animal est inoculé sur la peau épilée, rasée et scarifiée, avec

(1) NICOLAU et KOPCIOWSKA. *C. R. de la Soc. de Biol.*, **101**, 1929, p. 655.

du virus rabique des rues frais, en même temps que deux témoins qui succombent à la rage en vingt et vingt-deux jours. Notre animal, préparé antérieurement avec le virus formolé, survit; vingt-cinq jours plus tard, on l'inocule par voie sous-dure-mérienne avec le même virus rabique des rues, frais. Il ne présente rien de particulier par la suite, tandis que deux lapins témoins, inoculés par la même voie, meurent tous les deux de rage dans le délai habituel. Pendant les cinq mois suivants, cet animal immunisé est par trois fois inoculé à nouveau, toujours par voie cérébrale, avec un virus rabique des rues ayant servi dans des expériences antérieures sur les septinévrites rabiques (1) et avec un virus rabique fixe (souche D K) [2]. L'animal a très bien supporté ces inoculations sans montrer de symptômes morbides, et les témoins sont toujours morts de rage. Le lapin 331 N est donc un animal fortement immunisé contre la rage, ayant résisté à l'action pathogène de plusieurs virus rabiques d'Europe introduits par voie cérébrale. On l'inocule, toujours dans le cerveau, avec notre souche de virus des rues d'Oulou-fato (virus passé trois fois sur le lapin). Il survit sans montrer quoi que ce soit de particulier, et les deux lapins témoins inoculés en même temps, par la même voie et avec le même virus d'Oulou-fato, succombent tous les deux le dix-huitième jour, après un état paralytique de quatre jours, avec des altérations histologiques typiques dans le névraxe, et des inclusions cytoplasmiques caractéristiques au niveau de la corne d'Ammon.

Une autre inoculation faite au même animal immunisé contre la rage classique, environ quarante jours plus tard et par la même voie, mais avec du virus d'Oulou-fato renforcé, a eu le même résultat : le lapin immunisé n'a rien montré de particulier et le lapin témoin a succombé à la rage dans le délai habituel.

Cette expérience montre d'une manière indubitable qu'il y a *immunité croisée entre le virus rabique classique et notre virus de chien fou.*

(1) NICOLAU et GALLOWAY; NICOLAU et MATEESCO; NICOLAU DIMANESCO et GALLOWAY. *Loc. cit.*

(2) NICOLAU et KOPCIEWSKA. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 101, 1929, p. 655.

Un autre dispositif expérimental corrobore aussi cette conclusion :

Expérience. — Le lapin 957 R reçoit pendant 12 jours une inoculation quotidienne, sous-cutanée, de 2 cent. cubes d'émulsion au 1/20, non centrifugée, de virus rabique fixe (*souche D K*, virus très pathogène, qui tue le lapin infecté par voie sous-dure-mérienne en 4 à 6 jours). 64 jours plus tard, notre animal est inoculé dans le cerveau avec le virus rabique fixe *souche Ionesco* (1) [souche qui tue les lapins inoculés par cette voie, en 4 à 5 jours]. Un lapin témoin de cette inoculation d'épreuve (lapin 140 E) meurt de rage en 5 jours (contrôle histologique positif). Notre lapin 957 R montre une légère parésie lombaire le 7^e jour et se remet. 175 jours après cette inoculation cérébrale, donc 238 jours après le début de l'immunisation sous-cutanée, ce même animal est inoculé dans le cerveau avec notre virus de chien fou, virus fixé sur lapin et gardé dans la glycérine. Le témoin de cette inoculation, le lapin 233 E, meurt de rage en 10 jours (passages positifs, présence de corps de Negri). L'animal immunisé, le lapin 957 R, ne montre rien de particulier et survit; 5 mois plus tard, il vivait encore.

NEURO-INFECTIONS RABIKES MORTELLES AUTO-STÉRILISÉES.

L'immunité dans la rage s'installe à la suite de l'infection déclenchée dans le système nerveux par des germes plus ou moins atténués mais toujours vivants. L'état réfractaire acquis est donc la suite d'une neuro-infection auto stérilisée. Mais cette neuro-infection auto-stérilisée peut aboutir à la mort de l'animal par les altérations tissulaires qui prennent naissance sur place pendant le conflit entre les germes et le tissu sensible. C'est en considérant ce fait que nous avons défini la neuro-infection auto-stérilisée mortelle comme un *accident exceptionnel survenu pendant les étapes successives du processus qui tend à transformer l'état d'infection en état réfractaire* (2). Le tissu sensible se défend contre le germe antigène, et ce processus se traduit morphologiquement par des modifications his-

(1) D. IONESCO, *Bull. de l'Acad. de méd.*, **107**, 1932, p. 688.

(2) NICOLAU, *C. R. de la Soc. de Biol.*, **105**, 1930, p. 477.

tologiques plus ou moins intenses; quand celles-ci deviennent incompatibles avec la vie de l'animal (cependant que le virus est détruit par la lutte dont ces lésions démontrent l'intensité), on a ce qu'on appelle une neuro-infection auto-stérilisée mortelle. Ces cas sont donc des exemples *d'immunisation manquée* (1). C'est précisément pour cette raison que nous avons préféré les faire entrer, au cours de notre exposé, dans le chapitre de l'immunité.

Certains lapins rendus partiellement réfractaires contre la rage à l'aide d'injections sous-cutanées répétées de virus fixe pastorien, inoculés dans le cerveau avec notre souche de virus d'Oulou-fato des rues, succombent *tard* à l'infection conférée, et leur névraxe, quoique très riche en lésions rabiques et corps de Negri, se montre tout à fait dépourvu de germes. En voici quelques exemples :

A. Les lapins 327 R et 348 R, ayant reçu pendant dix-sept jours une injection quotidienne de 2 cent. cubes de virus pastorien, sont inoculés quatre-vingt-huit jours plus tard sous la dure-mère, avec notre virus du chien fou au cinquième passage sur lapin. La même émulsion qui est inoculée à ces deux lapins sert à inoculer par la même voie deux lapins témoins, qui meurent tous les deux le dix-huitième jour. Les lapins 327 R et 348 R meurent respectivement le trente et unième jour et le vingt et unième jour, avec des lésions intenses de rage dans tout le névraxe et présence de corps de Negri très nombreux. Un fragment du cerveau de lapin 348 R, émulsionné dans de l'eau physiologique, et inoculé dans le cerveau du lapin 579 R, ne détermine aucun trouble morbide et l'animal inoculé survit. Le névraxe du lapin 327 R sert à faire deux émulsions : une avec un fragment de cerveau, une autre avec une portion de la moelle dorso-lombaire. Ces deux émulsions inoculées dans le cerveau de deux lapins neufs se montrent également avirulentes. Dans le cerveau et la moelle des deux lapins rendus partiellement réfractaires contre la rage à la suite de la vaccination pastorienne, le virus d'Oulou-fato a provoqué des lésions intenses de rage (présence des corps de Negri), mais, à la mort des animaux, mort tardive, le germe était absent. La lutte entre le

(1) NICOLAU. *Loc. cit.*

tissu et le germe a abouti à la mort des animaux, avec stérilisation des germes.

Le même cas se présente dans l'expérience suivante :

B. Le lapin 420 R reçoit en trente jours quatre séries d'injections intradermiques de virus des rues (souche d'Europe) formolé. Inoculé ensuite sur la peau rasée et scarifiée avec le même virus des rues à l'état frais (qui tue 2 témoins infectés par cette même voie en vingt et un et vingt-trois jours), l'animal survit. Un mois plus tard, il est inoculé dans le cerveau avec notre virus d'Oulou-fato, en même temps que 2 témoins. Ces derniers meurent de rage en dix-sept et dix-huit jours, l'animal « vacciné » meurt tardivement, au bout de vingt-sept jours, avec lésions intenses dans son névraxe; nous y avons décelé de nombreux corps de Negri, mais pas la moindre trace de virus vivant (passages négatifs).

Enfin, voici encore l'histoire d'un autre lapin chez lequel une seule inoculation, en apparence sans effet, a provoqué un certain degré de résistance vis-à-vis du virus introduit ultérieurement dans son névraxe et a permis la réalisation d'une autostérilisation mortelle.

Il s'agit d'un lapin 551 R poids : 3.000 grammes), inoculé dans le testicule avec 2 cent. cubes d'une émulsion fraîche de virus d'Oulou-fato au quatrième passage par lapin. L'animal infecté par voie testiculaire ne présente rien d'anormal par la suite. Soixante-trois jours plus tard, il est inoculé dans le cerveau avec le même virus d'Oulou-fato. Les lapins témoins, infectés par la même voie avec la même émulsion virulente, meurent le dix-septième et le dix-neuvième jour. Notre lapin devient malade le vingt-quatrième jour et meurt paralysé neuf jours plus tard, le trente-troisième jour après l'inoculation, ayant perdu 1.200 grammes de son poids initial. On constate la présence des lésions rabiques caractéristiques et des corps de Negri dans son névraxe. Des émulsions de son cerveau et de la moelle sont inoculées sous la dure-mère de lapins neufs; ceux inoculés avec l'émulsion cérébrale survivent; sur 2 animaux inoculés avec l'émulsion de moelle, un survit, l'autre meurt de rage.

Il s'agit, dans ce cas, d'autostérilisation *partielle* des germes d'Oulou-fato introduits dans l'organisme d'un animal incomplètement immunisé.

Nous croyons inutile de multiplier les observations de ce genre. Remarquons seulement que les cas d'autostérilisation mortelle réalisés à l'aide de notre virus du chien fou sont de beaucoup plus fréquents que ceux obtenus chez les animaux

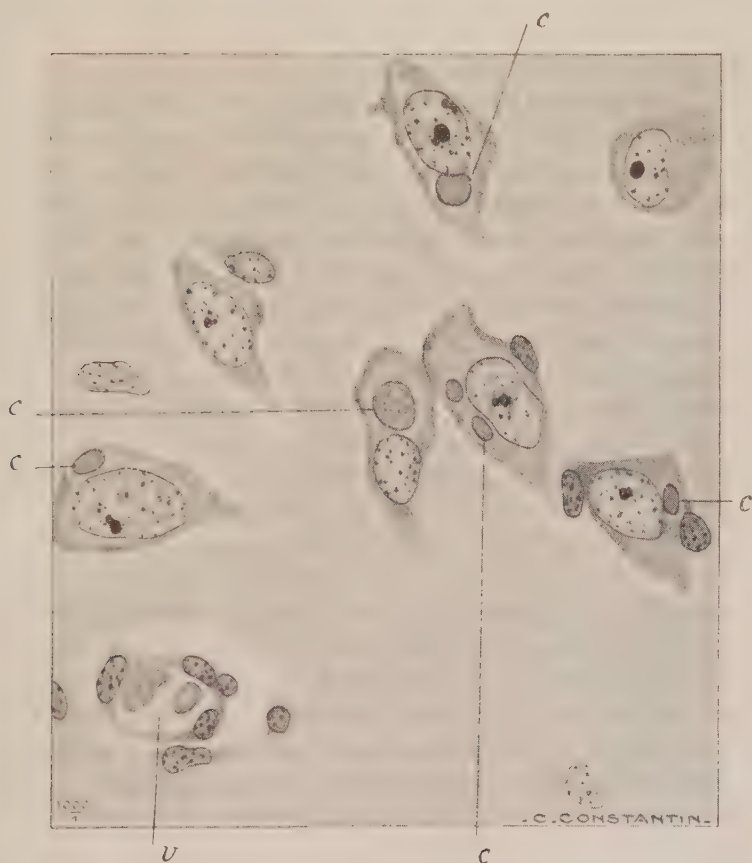


FIG. 26. — Lapin 577R, mort d'infection autostérilisée, vingt-quatre jours après l'inoculation sous-dure-mérienne d'un virus des rues de passage; corne d'Ammon; c, corps de Negri; v, vaisseau. Coloration Giemsa, gross. : 1.000.

immunisés également d'une manière incomplète et éprouvés par voie cérébrale avec les virus rabiques classiques.

En dehors de ces cas d'autostérilisation qui ont pris naissance chez des animaux partiellement réfractaires à l'aide d'injections préalables, nous avons observé des cas d'autostérilisation mor-

telle chez des lapins *non préparés par de telles injections*. Deux de ces cas, qui mettent en relief de manière très nette la virulence atténuée de notre souche d'Oulou-fato, ont été relatés à la page 790 (v. fig. 26). En voici un troisième, qui sera le dernier, car les arguments relatés tout le long de ce mémoire sont suffisamment nombreux pour convaincre que notre souche de virus possède une faible virulence.

Le lapin 524R est inoculé sur la peau rasée et scarifiée avec du virus frais d'Oulou-fato, provenant de l'encéphale du quatrième lapin de passage de cerveau à cerveau. L'animal devient paralysé le trente-deuxième jour et montre à ce moment des lésions d'automutilation (morsures multiples aux membres antérieurs). Il meurt trois jours plus tard. Lésions excessivement intenses de rage, dans le cerveau, la moelle, les ganglions spinaux et dans les racines nerveuses; beaux corps de Negri de fortes dimensions, au niveau de la corne d'Ammon. Une émulsion du cerveau de ce lapin, inoculée sous la dure-mère du lapin 573R, reste sans résultat.

Il s'agit bien d'un cas de neuro-infection rabique autostérilisée.

* *

Nous voilà au terme de notre exposé. Avant d'en tirer les conclusions, nous voulons discuter brièvement les remarques faites par M. Remlinger à propos de l'une de nos communications préliminaires sur la question du virus d'Oulou-fato. Dans la communication visée, nous avons été conduits à reconnaître à notre souche de virus des rues des caractères expérimentaux expliquant pourquoi l'Oulou-fato se transmet rarement à l'homme, bien que ce soit une vraie rage. Ces caractères révélés par nous, aboutissent à la conclusion que notre virus, isolé chez l'homme, produit, au début de l'expérimentation sur les animaux, une rage atténuée, ce que l'observation dans la nature confirme. Or, pour arriver à ce résultat, nous avons apporté des faits qui ne sont pas au gré de notre éminent confrère M. Remlinger. Ce savant trouve paradoxal le fait qu'un germe réputé comme ayant une faible virulence puisse engendrer une rage mortelle chez un enfant infecté par morsure. Mais, oublie-t-il que la maladie n'est que le résultat du conflit entre le germe

pathogène et le *terrain*? Nous répétons ce que nous avons dit par ailleurs (1) : ou bien l'enfant chez lequel la souche de virus s'est développée dans le névraxe était spécialement sensible à l'action des germes par une défaillance de la résistance spontanée de son système nerveux, ou bien cette souche était, en tant que souche d'Oulou-fato, particulièrement pathogène. Or, nos expériences ayant précisément montré combien peu virulente était cette souche à l'origine, on est forcé d'admettre que la maladie de cet enfant fut bien due à la défaillance de ses résistances spontanées. Il nous semble de toute façon qu'il n'est pas paradoxal de vouloir découvrir par la méthode expérimentale des raisons corroborant le fait indéniable que, dans la nature, l'Oulou-fato se communique rarement chez l'homme. Or, que nous enseigne la méthode expérimentale? La réponse, on l'obtient, en glanant des faits le long de ce mémoire :

1° Le germe isolé chez l'homme s'adapte difficilement au lapin, animal réputé très sensible à la rage, et le départ des séries de passages est très laborieux;

2° Certaines séries de passages, de cerveau à cerveau, s'arrêtent par autostérilisation mortelle spontanée;

3° Au cours de l'expérimentation, les cas d'autostérilisation mortelle sont de beaucoup plus fréquents avec notre virus qu'avec les souches rabiques classiques qui possèdent une activité pathogène normale;

4° Notre virus des rues *titre bas* : une émulsion de cerveau frais de lapin mort à la suite de l'infection conférée par voie cérébrale, diluée au 1/500 et introduite sous la dure-mère de lapins, donne encore la rage; mais au delà de cette dilution (au 1/1.000, au 2/1.000, au 5/1.000, etc.) l'émulsion perd son pouvoir pathogène;

5° Ce même virus des rues mis dans de la glycérine, à la glacière, s'atténue rapidement (quatorze jours) et finit par perdre complètement sa virulence au bout de trois ou quatre semaines.

6° Le germe à l'état de virus des rues se dissémine rarement dans l'organisme animal par voie nerveuse centrifuge

(1) NICOLAU, Discussion. *Bull. Soc. Path. exot.*, 25, 1932, p. 122.

(avirulence des nerfs et des organes); il n'arrive pratiquement pas aux glandes salivaires chez les lapins infectés par voie cérébrale.

Pour ces raisons, nous croyons que dans la nature la bave de l'animal mordeur peut être souvent avirulente.

Tous ces faits montrent bien que la virulence des germes de la maladie d'Oulou-fato, à l'état de virus des rues, est atténuée. « Aussi, nous sommes prêts à croire que quelques-unes de ces particularités, qui mettent d'accord certains résultats contradictoires relatés par nos devanciers, peuvent expliquer les différences constatées, tant en ce qui concerne la suite des morsures, qu'au point de vue clinique et expérimental, entre le virus de l'Oulou-fato et les virus rabiques d'Europe. Tout en étant parfaitement de l'avis de M. Remlinger quant à la nécessité d'administrer la vaccination antirabique aux individus mordus par des chiens fous, nous pensons que la croyance des indigènes à l'innocuité de la morsure repose très souvent sur une réalité confirmée par l'expérience. » « Mais, si à côté de nombreux cas de morsures non rabigènes, il existe de rares cas de rage humaine provoqués par la morsure des chiens fous — et le cas humain ayant servi comme point de départ à nos investigations en est un bel exemple — l'opinion de notre éminent collègue, M. Remlinger, est plus que justifiée : tout individu mordu par un chien suspect de rage, que la rage soit d'importation ou autochtone, doit se soumettre à la vaccination antirabique. »

Les dernières lignes extraites de notre travail critiqué par M. Remlinger n'ont pas été suffisantes pour apaiser sa crainte; en effet, il écrit : « au point de vue pratique, il peut être dangereux de répandre même parmi les médecins et les vétérinaires cette idée que le germe de la maladie de chien fou se dissémine rarement dans l'organisme animal, n'arrive que difficilement aux glandes salivaires et que la bave de l'animal mordeur peut souvent être avirulente. Il importe non seulement de soumettre au traitement antirabique les personnes mordues par des chiens atteints d'Oulou-fato, mais encore de leur faire suivre ce traitement le plus tôt possible après l'accident. La cure pastorienne est une lutte de vitesse entre le vaccin et le virus », etc.

Pour des raisons scientifiques, nous ne souscrivons pas au premier point de cette remarque, et en ceci nous témoignons notre estime au corps médical, qui, nous en sommes sûrs, sait discerner le côté théorique d'un problème et son côté pratique, en lisant un travail de laboratoire. Par ailleurs, nous sommes entièrement d'accord avec M. Remlinger, puisque, même avant de connaître ses inquiétudes, nous conseillions vivement le traitement antirabique à tout individu mordu par un chien suspect de rage, que cette rage soit d'importation ou autochtone.

Nous ne voulons pas abuser du lecteur pour répondre point par point à toutes les objections qui nous ont été faites. En voici pourtant une... Des irrégularités d'incubation analogues à celles enregistrées avec notre souche, dit-il, ont été signalées au Sénégal avec des virus de passage, avec le virus fixe de l'Institut Pasteur de Paris en particulier. A cette objection, nous pouvons répondre :

En premier lieu, c'est M. Remlinger lui-même qui a étudié (1) le comportement de certains virus rabiques à Paris, au Maroc et à Dakar; il sait bien, pour avoir travaillé avec une bonne technique, que le comportement « particulier » de diverses souches, transportées, en différents points du globe terrestre, plus près ou plus loin de l'Équateur, est surtout en fonction de la technique « particulière » de celui qui les manipule. Quant aux irrégularités d'incubation signalées au Sénégal à propos du virus fixe de Pasteur, l'un de nous, directeur de l'Institut Pasteur de Dakar, est en mesure d'affirmer que ce n'est pas le point de latitude terrestre qui influe sur le comportement dans l'organisme des animaux d'expérience, des germes rabiques importés au Sénégal, mais la technique du travailleur; une bonne technique ne permet pas au virus des incubations fantaisistes.

Mais cela est tout à fait secondaire. Le fait capital est l'affirmation de notre contradicteur que le virus des rues ayant servi dans nos expériences, n'était pas — encore que nous l'ayons constaté avec des preuves à l'appui — un virus atténué. Le qualificatif de « virulence atténuée » accordé à

(1) REMLINGER, M. LEGER et TEPPAZ, *loc. cit.*

notre germe, qui avait tué un enfant, lui paraît paradoxal; et, M. Remlinger de s'exclamer : « paradoxe pour paradoxe, on pourrait soutenir avec une apparence de raison au moins égale, que ce virus, loin d'être atténué, était au contraire renforcé ». Sans jongler avec les paradoxes, nous *prouvons* dans le texte de notre travail présent, que le virus d'Oulou-fato atténué à l'origine, au début de nos expériences, alors qu'il se trouvait à l'état de virus des rues, s'est renforcé *par la suite* seulement, au moment où l'entraînement sur lapins lui a conféré une virulence exaltée. On connaît la plasticité des virus neurotropes en général, celle du virus rabique en particulier. Ainsi notre virus, qui titrait dans des dilutions au début des expériences 1/500 seulement, a titré plus tard 1/20.000. La glycérine le stérilisait au début en trois ou quatre semaines; une fois renforcée, sa virulence y est respectée pendant plusieurs mois. L'incubation très raccourcie du virus fixe se fait — par contraste avec celle du virus des rues — avec une régularité mathématique, et les animaux n'échappent plus à la maladie et ne réalisent plus d'infections autostérilisées. Tous ces arguments montrent l'erreur d'interprétation de notre contradicteur, qui pourtant, sur les faits, ne peut pas ne pas être d'accord avec nous.

Conclusions générales.

Il existe en Afrique occidentale française, à côté de la rage canine commune importée d'Europe, une maladie spéciale autochtone, appelée dans le dialecte bambara : Oulou-fato, ou maladie du chien fou, maladie qui ne serait pas transmissible à l'homme. Cette croyance de la non transmissibilité à l'homme, universellement répandue parmi les indigènes, et partagée par nombre d'Européens, semble appuyée par le fait que les documents du Service de Santé, jusqu'à ces dernières années, ne font pas mention de cas de rage humaine en Afrique occidentale française.

La majorité des expérimentateurs qui ont voulu étudier cette maladie en Afrique, se trouvant placés dans des conditions peu favorables, n'ont pu faire que des expériences incomplètes. Ils reconnaissent n'avoir pas pu en fixer la virulence.

Il nous a été donné de pouvoir étudier une souche de virus de chien fou. Mais, alors que les expérimentateurs qui nous ont précédés avaient prélevé les centres nerveux sur le cadavre d'un chien, l'origine de notre virus provient d'un cas humain.

Ce germe s'est montré, au début de nos expériences, peu virulent; le départ difficile des passages en série sur lapins, ainsi que les arrêts des lignées de passages par « neuro-infections autostérilisées » en font preuve. En nous mettant dans des conditions particulières, nous avons obtenu de cette même souche de virus des rues deux virus fixes : l'un tuant le lapin inoculé dans le cerveau en huit à dix jours, l'autre en dix à douze jours.

Le cerveau de lapins morts de cette rage présente des corps de Negri. Ces inclusions diminuent en volume et en nombre au fur et à mesure des passages en série pendant le processus de transformation du virus des rues en virus fixe. Le noyau optique basal est la seule région où les corps de Negri restent nombreux et de dimensions importantes, même après quarante passages cérébraux et alors que la souche est fixée depuis longtemps.

Le germe est invisible et non cultivable dans les milieux habituels; la centrifugation même prolongée n'enlève pas la virulence des émulsions. Le virus des rues, en dilutions, titre 1/500; une fois le virus fixé sur lapin, le titre augmente à 1/20.000. La glycérine atténue vite la virulence du virus des rues (trois à quatre semaines), beaucoup moins vite celle du virus fixe (trois à quatre mois). Soumis à l'électrophorèse, les substances qui servent de support au germe se montrent électro-négatives.

Le lapin et le cobaye sont plus sensibles à l'action pathogène du virus que le rat, la souris, le chien et la poule.

La maladie conférée au lapin à l'aide du virus des rues introduit sous la dure-mère est une rage dont la phase paralytique est précédée par une période d'excitation particulière et par des phénomènes de contracture intense. Le virus fixe confère une rage paralytique, mue, de courte durée. Inoculé sur la peau, dans les muscles, dans la chambre postérieure de l'œil, sur la cornée, dans les veines ou dans le sciatique, le virus des rues tue les lapins, de manière inconstante. A l'encontre de ce qui arrive avec les virus rabiques des rues classiques, la septinévrite

provoquée par notre germe dans l'organisme du lapin est mise en évidence très difficilement par l'inoculation de tronçons de nerfs. Ce même germe, introduit dans le cerveau des lapins, ne peut pas être retrouvé dans les organes ou dans les humeurs, à l'exclusion du névraxe.

Nous avons été conduits à reconnaître à notre souche des caractères expérimentaux expliquant que l'Oulou-fato se transmette rarement chez l'homme.

Les altérations histo-pathologiques du système nerveux central, viscéral et périphérique des animaux inoculés avec le virus d'Oulou-fato sont celles de la rage. Les corps de Negri trouvés dans les neurones, à n'importe quel niveau, sont en général différents de ceux de la rage classique par leur colorabilité; ils se colorent presque toujours en bleu par la méthode de Mann, n'ayant pas l'affinité oxyphile des corpuscules cytoplasmiques qui caractérisent la rage. Le polymorphisme des inclusions trouvées dans la maladie du chien fou est très accentué. Des neurones en état avancé de dégénérescence renferment souvent des inclusions.

Il existe une immunité croisée parfaite entre les souches de rage classique et notre virus d'Oulou-fato.

En plus des données acquises sur le virus de l'Oulou-fato, deux enseignements plus généraux découlent de ce travail :

1° Il peut exister des souches de virus rabique des rues qui, inoculées à des lapins, ne provoquent pas l'apparition de corps de Negri ayant l'affinité oxyphile habituelle; la coloration au Mann ne peut pas, dans ce cas, les mettre en évidence de manière manifeste; celle au Giemsa lent est donc plus indiquée pour affirmer avec plus de certitude leur présence ou leur absence;

2° La région d'élection où prennent naissance les corps de Negri, même dans la rage provoquée par le virus fixe, est, chez le lapin, le noyau optique basal.

(Instituts Pasteur de Paris et de Dakar.)

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Lapin 594R, mort seize jours après inoculation cérébrale d'Oulou-fato (virus des rues); cerveau, Corne d'Ammon. *c*, corps de Negri volumineux, colorés en bleu par la méthode de Mann, contrastant avec les hématies (*h*) colorées en rouge; 1.000/1.

FIG. 2. — Singe 3, mort vingt jours après inoculation sous-dure-mérienne de virus d'Oulou-fato (virus des rues); cerveau, écorce occipitale; *c*, corps de Negri volumineux, colorés en bleu ou en bleu-violet par la méthode de Mann, contrastant avec les hématies colorées en rouge vif (*h*); *i*, petites inclusions intracytoplasmiques, oxyphiles, très polymorphes, revêtant l'aspect cocciforme, bacilliforme, etc. Aggr. 1.000/1.

FIG. 3. — Même animal que dans la figure 2; cerveau; corne d'Ammon; dans le même champ microscopique, des corps de Negri à colorabilité variable : *r*, corps de Negri libre, en dehors de cellules, coloré en rouge; *r'*, corps de Negri coloré en rouge; *v*, corps de Negri coloré en violet; *b*, corps de Negri coloré en bleu; *i*, inclusions rabiques revêtant l'aspect bactériforme Coloration Mann; 800/1.

FIG. 4. — Chien 1; corne d'Ammon. *s1*, corps de Negri revêtant l'aspect de « sacs remplis de grains »; les formations contenues dans ce corps sont rondes, égales et bien isolées les unes des autres; *s2*, les formations qui remplissent ce corps de Negri sont irrégulières, plus ou moins agglutinées et très peu individualisées; *s3* et *s4*, petits corps de Negri libre, constitué par des amas de formations bactériformes à l'intérieur d'une gangue; *s5*, gros corps de Negri libre, dont le contenu est particulièrement net : graines plus ou moins rondes, bien distinctes les unes des autres; *c*, corps de Negri vacuolé, à aspect très peu précis, flou, coloré en violet. Coloration Mann; aggr. 1.000/1 (on peut suivre sur certaines préparations tous les stades de transition entre les « sacs à grains » et les corps de Negri à structure classique).

FIG. 5. — Chien; cerveau; corne d'Ammon; deux neurones renfermant dans leur cytoplasme des corps de Negri dont l'aspect de « sacs à grains » est très net. *s*, un corps de Negri à contenu bactériforme; *sl*, corps de Negri libre, de même aspect; *h*, hématies. Coloration Mann; aggr. 1.000/1.

FIG. 7 et 8. — Lapin 704R, mort dix-huit jours après inoculation cérébrale de virus d'Oulou-fato (virus des rues); neurones de la corne d'Ammon; *s*, « sacs à grains ». Coloration Mann; aggr. 1.000/1.

FIG. 6, 9, 10, 11 et 12. — Chien mort de rage à virus d'Oulou-fato. Neurones de la corne d'Ammon renfermant des inclusions à aspect de « sacs à grains ». *s*, corps de Negri dont le contenu est très net; *c*, corps de Negri à aspect classique. Coloration Mann; aggr. 1.000/1.

FIG. 13, 14, 15 et 16. — Lapin 431R, mort quatre-vingt-sept jours après inoculation du virus d'Oulou-fato (virus des rues) dans les muscles de la nuque. Cellules nerveuses en état avancé de dégénérescence, renfermant dans le cytoplasme des corps de Negri. *n*, noyau dégénéré; *c*, corps de Negri. Coloration au Giemsa lent; aggr. 1.000/1.

RECHERCHES SUR LA NUTRITION DE QUELQUES EUGLÈNES

II (1). — *EUGLENA STELLATA*, *KLEBSII*, *ANABÆNA*, *DESES* et *PISCIFORMIS*

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

par HISATAKE DUSI.

(Laboratoire de Protistologie de l'Institut Pasteur.)

Euglena stellata.

HISTORIQUE. SOUCHE. MILIEU D'ENTRETIEN.

HISTORIQUE. SOUCHE. — *Euglena stellata* a été décrite par Mainx en 1926.

C'est également Mainx qui a réalisé la culture pure de cette espèce, culture qu'il nous a envoyée en 1929. *Euglena stellata* n'avait fait, jusqu'à nos travaux, l'objet d'aucune étude physiologique particulière.

Nous noterons simplement que, d'après Mainx, *E. stellata* se rapproche d'*E. viridis*.

MILIEU D'ENTRETIEN. — Le milieu d'entretien a été le même que pour *Euglena gracilis* :

| | |
|---|--------|
| Peptone (M. B. T. A.) | 2,0 |
| MgSO ₄ | 0,2 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 |
| KCl | 0,2 |
| Fe ₂ Cl ₆ | 0,0025 |
| Eau distillée | 1.000 |

Dans ce milieu, à pH 7.0, nous n'avons observé qu'une culture pauvre, uniquement constituée par des formes palmelloïdes. Nous avons alors étudié des milieux à des pH divers.

(1) Voir ces *Annales*, t. L, avril 1933, p. 550.

| | FLAGELLÉS par millimètre cube |
|--|----------------------------------|
| Très bonne culture correspond à une densité de . . | 60 à 200 |
| Bonne culture correspondant à une densité de . . | 30 à 60 |
| Culture pauvre correspondant à une densité de . . | 3 à 30 |
| Culture très pauvre correspondant à une densité de . | Moins de 3. |

| | |
|--------------|---|
| pH 4,0 . . . | Pas de culture. |
| pH 4,5 . . . | Culture pauvre, palmelloïdes. |
| pH 5,0 . . . | Culture pauvre, quelques flagellés. |
| pH 5,5 . . . | Très bonne culture : flagellés, pas de palmelloïde. |
| pH 6,0 . . . | Culture pauvre, quelques flagellés. |
| pH 6,5 . . . | Culture pauvre, rares flagellés : palmelloïdes. |
| pH 7,0 . . . | Culture pauvre : palmelloïdes. |
| pH 7,5 . . . | Culture pauvre : palmelloïdes. |
| pH 8,0 . . . | Culture pauvre : palmelloïdes. |
| pH 8,5 . . . | Pas de culture. |

Nous voyons donc que les limites extrêmes de culture pour *E. stellata* sont voisines de pH 4,5 et 8,0. D'autre part, alors que pour *E. gracilis* la zone de pH permettant une bonne culture est très étendue, comprise entre 3,0 et 8,5, pour *E. stellata* on n'obtient de bonnes cultures abondantes, renfermant uniquement des formes flagellées, qu'au voisinage de pH 5,5. La zone favorable est très peu étendue puisque, déjà à pH 5,0 et 6,0, on voit apparaître de nombreux palmelloïdes.

Cette constatation était pour nous extrêmement importante, car elle nous permettait d'étudier la nutrition d'*Euglena stellata* dans des conditions favorables, c'est-à-dire dans des milieux de pH 5,5. Il serait en effet illusoire d'étudier la nutrition dans des milieux différents, de pH 5,5, le mauvais développement des cultures serait dû en premier lieu à la réaction défavorable du milieu.

Toutes nos expériences ont donc été réalisées dans des milieux de pH 5,5. Nous avons constaté ultérieurement que l'eau peptonée (eau distillée 1.000, peptone pancréatique de muscle [5 C] 4 grammes), convenait parfaitement pour l'entretien des cultures.

NUTRITION A LA LUMIÈRE.

a) NUTRITION MINÉRALE. — La nutrition a été tout d'abord étudiée dans le milieu suivant :

| | |
|---|--------|
| MgSO ₄ | 0,2 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 |
| KCl. | 0,2 |
| Chlorure ferrique. | 0,0025 |
| Eau bi-distillée. | 1.000 |

L'aliment azoté était ajouté à raison de 1 gramme pour 1.000 cent. cubes de milieu et le pH amené à 5,5. L'ensemencement a été pratiqué avec 1 goutte d'une culture en milieu à l'asparagine.

Nous jugeons inutile de donner ici le détail de nos expériences. Les cultures ont été observées très longtemps — jusqu'à quatre mois — et toujours jusqu'à la décroissance de la culture. Nous résumons donc très brièvement nos essais :

Nitrate de calcium.

| | |
|--------------------------|--------------------------------------|
| Premier repiquage . . . | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage. . . | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage. . . | Cultures assez bonnes, anneau épais. |
| Quatrième repiquage . . | Cultures assez bonnes, anneau. |

Nitrate de sodium.

| | |
|------------------------------|------------------------|
| Premier repiquage | Cultures très pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage. | Cultures assez bonnes. |
| Quatrième repiquage. | Cultures pauvres. |

Nitrate de potassium.

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| Premier repiquage | Cultures très pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures très pauvres. |
| Troisième repiquage | Pas de cultures. |

Nitrate d'ammonium.

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures assez bonnes. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage. | Cultures pauvres. |

Phosphate d'ammonium.

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage. | Cultures très pauvres. |

Sulfate d'ammonium.

Premier repiquage Cultures très pauvres.
Deuxième repiquage Pas de culture.

On voit donc que seul le nitrate de calcium a permis d'assez bonnes cultures d'*E. stellata*. Les autres sels : nitrate de sodium, nitrate d'ammonium, phosphate d'ammonium, n'ont permis que des cultures très pauvres. Le sulfate d'ammonium n'a pas permis de repiquages en série, non plus que le nitrate de potassium.

Il nous est apparu que, dans ces expériences, le calcium pouvait jouer un rôle important. Il paraissait *a priori* étonnant que les sels d'ammonium donnent des résultats inférieurs aux sels nitriques, et nous avons pensé à ajouter du calcium au milieu à base de phosphate d'ammonium.

Nous avons remplacé dans le milieu donné ci-dessus (v. p. 842) le chlorure de potassium par du chlorure de calcium. Nous avons essayé plusieurs doses de chlorure de calcium : 0,01, 0,02, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 p. 1.000.

La concentration optimum a été : 0,1 et 0,2 p. 1.000.

A partir du milieu à base d'asparagine, nous avons doncensemencé avec 1 goutte de culture plusieurs tubes des milieux suivants :

- 1° Milieu minéral + phosphate d'ammonium + CaCl_2 . 0,01 p. 100
- 2° Milieu minéral + phosphate d'ammonium + CaCl_2 . 0,02 —
- 3° Milieu minéral + phosphate d'ammonium + CaCl_2 . 0,1 —
- 4° Milieu minéral + phosphate d'ammonium + CaCl_2 . 0,2 —
- 5° Milieu minéral + phosphate d'ammonium + CaCl_2 . 0,5 —
- 6° Milieu minéral + phosphate d'ammonium + CaCl_2 . 1,0 —
- 7° Milieu minéral + phosphate d'ammonium Témoin.
- 8° Eau distillée + peptone : 5 C.

- Dans les milieux 1. Culture très pauvre.
- Dans les milieux 2. Culture pauvre.
- Dans les milieux 3. Bonne culture.
- Dans les milieux 4. Bonne culture.
- Dans les milieux 5. Culture pauvre.
- Dans les milieux 6. Culture très pauvre.
- Dans les milieux 7. Culture très pauvre.
- Dans les milieux 8. Très bonne culture.

On voit donc que le chlorure de calcium exerce, à dose favorable, une action manifeste sur le développement des cultures

d'*E. stellata*. Le phosphate d'ammonium ne permet que des cultures très pauvres en l'absence de calcium. Si l'on ajoute du chlorure de calcium à la dose de 0,1 ou 0,2 p. 1.000, on améliore la culture dans les milieux au phosphate d'ammonium.

Avec aucune des autres espèces d'Euglènes étudiées, nous n'avons observé de semblables résultats. Le calcium, existant dans les milieux à l'état de traces, suffit à assurer le développement normal. *E. stellata* — qui manifeste un besoin particulier de calcium — est à ce point de vue isolée dans le groupe des Euglènes. Nous n'avons malheureusement pas pu étudier la nutrition autotrophe d'*E. stellata* avec d'autres aliments minéraux : nitrate de Na et de K, sulfate d'ammonium en présence de calcium.

La seule conclusion que nous puissions tirer de ces expériences est : 1° que *E. stellata* est un organisme autotrophe ; 2° que le calcium lui est indispensable.

b) NUTRITION ORGANIQUE. — Pour la nutrition à la lumière, nous avons, comme pour *Euglena gracilis*, étudié la valeur nutritive d'un certain nombre d'acides aminés ou de peptones.

Nous avons utilisé le milieu dont la formule a été donnée p. 842. A ce milieu, on ajoutait les acides aminés à une concentration de 2 p. 1.000. Le pH du milieu était naturellement amené à 5,5. Cependant, nous avons toujoursensemencé en même temps des tubes du même milieu de pH 7,0.

ACIDES AMINÉS.

Glycocolle.

| | pH 5,5 | pH 7,0 |
|-----------------------------|------------------|---------------|
| Premier repiquage | Pauvres. | Très pauvres. |
| Deuxième repiquage | Bonnes, anneau. | Très pauvres. |
| Troisième repiquage | Pauvres, anneau. | |
| Quatrième repiquage. . . . | Bonnes, anneau. | |

Remarque : Troisième et quatrième semaines : pH 5,5 (pas de changement).

Alanine droite.

| | pH 5,5 | pH 7,0 |
|-----------------------|----------------------|------------------|
| Premier repiquage . . | Pauvres. | Pas de cultures. |
| Deuxième repiquage . | Pauvres, anneau. | |
| Troisième repiquage . | Très bonnes, anneau. | |
| Quatrième repiquage . | Bonnes, anneau. | |

Remarque : Deuxième et septième semaines : pH 5,0.

Valine racémique.

| | pH 5,5 | pH 7,0 |
|---------------------------|------------------|-----------------|
| Premier repiquage . . . | Très pauvres. | Pas de cultures |
| Deuxième repiquage . . . | Pauvres, anneau. | |
| Troisième repiquage . . . | Pauvres, anneau. | |
| Quatrième repiquage . . | Bonnes, anneau. | |

Remarque : Troisième semaine : pH 5,0; quatrième semaine : pH 4,8.

Leucine gauche.

| | pH 5,5 | pH 7,0 |
|-----------------------|----------------------|------------------|
| Premier repiquage . . | Pauvres, anneau. | Pauvres. |
| Deuxième repiquage . | Bonnes, anneau. | Pas de cultures. |
| Troisième repiquage . | Pauvres, anneau. | |
| Quatrième repiquage . | Très bonnes, anneau. | |

Remarque : Quatrième, sixième et septième semaines : pH 5,5; quatrième et septième semaines : pH 7,0.

Sérine racémique.

| | pH 5,5 | pH 7,0 |
|-------------------------------|------------------|---------------|
| Premier repiquage | Bonnes, anneau. | Très pauvres. |
| Deuxième repiquage | Pauvres. | |
| Troisième repiquage | Pauvres, anneau. | |
| Quatrième repiquage | Bonnes, anneau. | |

Remarque : Quatrième, cinquième et sixième semaines : pH 5,5.

Phénylalanine racémique.

| | pH 5,5 | pH 7,0 |
|-------------------------------|----------|------------------|
| Premier repiquage | Bonnes. | Pas de cultures. |
| Deuxième repiquage | Pauvres. | |
| Troisième repiquage | Pauvres. | |
| Quatrième repiquage | Pauvres. | |

Remarque : Quatrième, cinquième et septième semaines : pH 5,5.

Tyrosine gauche.

| | pH 5,5 | pH 7,0 |
|-----------------------------|--|--------------|
| Premier repiquage | Quelques palmelloïdes. Pas de cultures. | Pas du tout. |

Remarque : Dixième semaine : pH 5,5.

Histidine (monochlorhydrate).

| | pH 5,5 | pH 7,0 |
|-------------------------------|---------|------------------|
| Premier repiquage | Bonnes. | Pauvres. |
| Deuxième repiquage | Bonnes. | Pas de cultures. |
| Troisième repiquage | Bonnes. | |
| Quatrième repiquage | Bonnes. | |

Remarque : Troisième, quatrième et septième semaines : pH 5,5.

Arginine droite (basique).

| | pH 5,5 | pH 7,0 |
|-------------------------------|---------------|----------|
| Premier repiquage | Assez bonnes. | Pauvres. |
| Deuxième repiquage | Pauvres. | |
| Troisième repiquage | Assez bonnes. | |
| Quatrième repiquage | Très pauvres. | |

Remarque : Il y a une légère acidification du milieu qui a été amené à pH 4,6 et 5,0.

Lysine droite.

| | pH 5,5 | pH 7,0 |
|-------------------------------|--------------|--------------|
| Premier repiquage | Bonnes. | Pauvres. |
| Deuxième repiquage | Bonnes. | Bonnes. |
| Troisième repiquage | Bonnes. | Bonnes. |
| Quatrième repiquage | Très bonnes. | Bonnes. |
| Cinquième repiquage | | Très bonnes. |

Remarque : Quatrième, cinquième, septième semaines : pH 6,0-6,2 (départ 5,5). Départ 7,0 : pas de changement.

Dans ce milieu il n'y a pas de différence de la culture pH 5,5 et 7,0.

Proline racémique.

| | pH 5,5 | pH 7,0 |
|-------------------------------|---------|---------------|
| Premier repiquage | Bonnes. | Très pauvres. |
| Deuxième repiquage | Bonnes. | |
| Troisième repiquage | Bonnes. | |
| Quatrième repiquage | Bonnes. | |

Remarque : Quatrième et cinquième semaines : pH 4,5-4,8.

Acide aspartique gauche.

| | <u>pH 5,5</u> | <u>pH 7,0</u> |
|-------------------------------|---------------|-----------------------------|
| Premier repiquage | Très bonnes. | Pauvres. |
| Deuxième repiquage | Pauvres. | Très pauvres, palmelloïdes. |
| Troisième repiquage | Bonnes. | |
| Quatrième repiquage | Pauvres. | |

Remarque : Quatrième, cinquième et sixième semaines : pH 5,5.

Acide glutannique droit.

| | <u>pH 5,5</u> | <u>pH 7,0</u> |
|-------------------------------|---------------|------------------|
| Premier repiquage | Bonnes. | Pauvres. |
| Deuxième repiquage | Pauvres. | Pas de cultures. |
| Troisième repiquage | Pauvres. | |
| Quatrième repiquage | Bonnes. | |

Remarque : Quatrième, cinquième et sixième semaines : pH 5,5.

Asparagine gauche.

| | <u>pH 5,5</u> | <u>pH 7,0</u> |
|-------------------------------|---------------|---------------|
| Premier repiquage | Bonnes. | Pauvres. |
| Deuxième repiquage | Bonnes. | Pauvres. |
| Troisième repiquage | Bonnes. | Très pauvres. |
| Quatrième repiquage | Bonnes. | |

Remarque : Quatrième et cinquième semaines : pH 5,5 (départ 5,5); sixième et septième semaines : pH 6,8 (départ 7,0).

On voit donc d'après ces expériences :

Que la lysine est l'acide aminé le plus favorable.

L'alanine, la leucine, l'histidine, la proline, l'asparagine sont de bons aliments azotés, ainsi que la sérine.

Le glycocolle, la valine, la phénylalanine, l'acide aspartique et l'acide glutamique sont utilisables, ainsi que l'arginine.

Est inutilisable : la tyrosine.

D'autre part, on voit qu'à pH 7,0 les cultures ont été pauvres ou nulles, en tous cas non repiquables en série, sauf pour la lysine.

Les cultures en milieu à la lysine donnent les mêmes excellents résultats à pH 5,5 et à pH 7,0. La culture en milieu de pH 7,0 a été conduite presque au cinquième repiquage et toujours montré des cultures abondantes.

PEPTONES. — Quatre peptones ont été étudiées :

Peptone pepsique de viande, peptone pancréatique 5 C, peptone de muscle de bœuf, très aminée (M. B. T. A), peptone de soie, toutes à une concentration de 2 p. 1.000.

L'ensemencement a été fait avec 1 goutte de culture en milieu peptoné.

Peptone pepsique de viande. — A pH 5,5, deux essais ont donné de bonnes cultures; il n'a pas été fait de repiquages en série.

A pH 7,0, un essai a montré des cultures très pauvres.

Peptone pancréatique de viande (début de digestion) [5 C]. — Dans des milieux de pH 5,5, il a été fait cinq repiquages successifs : toujours très bonnes cultures.

Si l'on supprime la partie minérale du milieu, les résultats sont les mêmes, et c'est le milieu : eau distillée 1.000, peptone 5 C, que nous utilisons maintenant pour l'entretien de nos cultures.

A pH 7,0, au premier ensemencement, on voit quelques formes palmelloïdes. Il n'y a pas de multiplication. Ces essais de culture ont été suivis pendant trois mois : il n'y a jamais eu ébauche de développement.

Peptone pancréatique de viande (digestion très poussée) [M. B. T. A.]. — A pH 5,5, les cultures sont toujours bonnes (4 repiquages), un peu moins riches toutefois que dans le milieu à la peptone 5 C.

A pH 7,0, mêmes résultats qu'avec la peptone 5 C.

Peptone de soie. — A pH 5,5, la soie hydrolysée permet également de bonnes cultures (3 repiquages). Culture moins riche qu'avec la peptone M. B. T. A.

A pH 7,0 : pas de culture.

Les meilleurs résultats sont donc fournis par la peptone de muscle ayant subi un début de digestion pancréatique. Le muscle ayant subi une digestion pancréatique prolongée et la soie hydrolysée permettent de bonnes cultures, mais moins riches qu'avec la peptone 5 C.

La peptone 5 C donne des résultats meilleurs que le plus favorable des acides aminés, c'est-à-dire la lysine.

ESSAIS DE CULTURE A L'OBSCURITÉ.

Nous avons essayé d'entretenir *E. stellata* à l'obscurité.

Les premiers essais ont été réalisés avec un milieu peptoné à 2, 4 et 10 p. 1.000 (peptone 5 C), de pH 5,5. Résultats négatifs. Même au premier ensemencement, pas de culture, même si l'ensemencement est pratiqué avec VIII gouttes de culture. Il y a simplement transformation des flagellés, ou tout au moins de la majorité des flagellés, en palmelloïdes.

Nous avons pensé à ajouter au milieu de l'acétate de sodium (2 p. 1.000). Les résultats ont été négatifs, comme aussi après addition de pyruvate et de lactate de sodium.

Avec le tartrate de sodium et la glycérine, il y a un très faible développement qui s'est arrêté au deuxième repiquage.

Le propionate de sodium a donné de très bonnes cultures au premier et au deuxième repiquage. Le troisième repiquage n'a donné que des cultures très pauvres, impossibles à repiquer.

Il ne nous a donc pas été possible de cultiver *E. stellata* à l'obscurité.

CONCLUSIONS.

E. stellata constitue, nous l'avons vu, une espèce très sensible à la réaction du milieu (pH optimum 5,5). Nous avons vu, d'autre part, que l'*E. stellata* ne se satisfait pas des traces de calcium qui se trouvent dans les milieux minéraux habituels. Une proportion assez importante de calcium doit être présente dans le milieu pour permettre la multiplication. A ce point de vue, *E. stellata* diffère de toutes les autres Euglènes étudiées.

E. stellata est d'autre part jusqu'à maintenant le seul Euglénien pour lequel la lysine constitue le plus favorable des acides aminés. D'autre part, alors que les milieux peptonés de pH 7,0 ne permettent pas la multiplication d'*E. stellata*, les milieux à base de lysine permettent des cultures fort riches.

Nous pouvons donc indiquer comme principales caractéristiques physiologiques d'*E. stellata* :

- 1° La zone étroite de pH favorable, avec optimum à 5,5;
- 2° Le besoin en calcium;
- 3° Le fait que la lysine est un aliment très favorable.

Nous remarquerons enfin que, comme *E. gracilis*, *E. stellata* est un organisme autotrophe. Mais la lumière lui est indispensable; *E. stellata* est donc obligatoirement phototrophe.

Euglena klebsii.

HISTORIQUE. SOUCHE. MILIEU D'ENTRETIEN.

Lemmermann a créé une variété *Klebsii* pour une forme particulière d'*Euglena intermedia* (Klebs) Schmitz.

Mainx (1928) a jugé que la variété *Klebsii* devait constituer une espèce distincte de *E. intermedia*. Cette espèce doit donc se nommer *E. klebsii* (Lemm.) Mainx.

La souche que nous avons étudiée a été isolée en culture bactériologiquement pure par F. Mainx, qui en a fait une étude physiologique assez poussée.

Dans un milieu à base d'extrait de viande de Liebig, Mainx trouve qu'une réaction acide est plus favorable qu'un milieu neutre. Les milieux alcalins sont défavorables.

Comme aliment azoté, *E. klebsii* peut utiliser le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium et le nitrate de potassium, qui permettent de bonnes cultures dans les milieux acides (Pas de cultures dans les milieux alcalins). Mainx n'indique pas le nombre de repiquages qu'il a effectués et n'a pas précisé le pH des milieux de culture.

Mainx a étudié d'autre part la nutrition carbonée à la lumière dans un milieu ainsi constitué : $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 0,5, KH_2PO_4 0,2 MgSO_4 0,1 — eau 1.000 — additionné d'acides organiques divers et dont le CO_2 était éliminé.

Tous les essais ont été négatifs, quel que soit l'acide organique ajouté : acide acétique, propionique, butyrique (sels de sodium), lactate de calcium, malate de potassium, citrate de sodium, tartrate de potassium (1 p. 1.000). Mêmes résultats négatifs si on ajoute au milieu du glucose, du saccharose, de la mannite ou de la glycérine.

D'après Mainx, *E. klebsii* est obligatoirement autotrophe au point de vue du métabolisme carboné, c'est-à-dire que l'assimilation chlorophyllienne lui est indispensable.

Nous ne parlerons que pour mémoire des travaux de Linsbauer (1915) qui n'a pas eu de cultures bactériologiquement pures.

MILIEU D'ENTRETIEN (pH optimum). — Nous avons d'abord déterminé dans un milieu à base de peptone M. B. T. A. le pH optimum pour le développement.

| | FLAGELLÉS par millimètre cube |
|--|----------------------------------|
| Très bonne culture correspond à une densité de plus de | 67 |
| Bonne culture correspond à une densité de | 30 à 67 |
| Culture pauvre correspond à une densité de. . . . | 3 à 30 |
| Culture très pauvre correspond à une densité de . | Moins de 3. |

| | |
|--------------------|------------------------|
| pH 4,0 | Cultures très pauvres. |
| pH 4,5 | Cultures très pauvres. |
| pH 5,0 | Cultures très pauvres. |
| pH 5,5 | Cultures pauvres. |
| pH 6,0 | Assez bonnes cultures. |
| pH 6,5 | Assez bonnes cultures. |
| pH 7,0 | Assez bonnes cultures. |
| pH 7,5 | Cultures pauvres. |
| pH 8,0 | Cultures pauvres. |
| pH 8,5 | Cultures pauvres. |

Dans nos premiers essais (1930 c), nous avons indiqué comme limite de développement 5,5 et 7,5. En réalité, il y a des cultures pauvres à pH 4,0 et 8,5. Mais les Euglènes tombent très rapidement au fond des tubes, ce qui peut faire penser qu'on se trouve en présence de cadavres. En réalité, on peut repiquer les cultures avec le dépôt.

La zone optimum pour le développement d'*E. klebsii* est donc comprise entre pH 6,0 et 7,0. Toutes nos expériences ont été faites soit à pH 7,0, soit à pH 6,5 et 7,0.

Comme milieu d'entretien, nous avons utilisé le milieu suivant :

| | |
|------------------------------------|--------|
| Sulfate de magnésium | 0,2 |
| Phosphate monopotassique | 0,2 |
| Chlorure de potassium | 0,2 |
| Chlorure ferrique | 0,0025 |
| Asparagine | 2 |
| Acétate de sodium | 2 |
| Eau distillée | 1.000 |
| NaOH, q. s. pour pH 6,5. | |

NUTRITION A LA LUMIÈRE.

a) NUTRITION MINÉRALE. — Dans le milieu ci-dessus, l'asparagine et l'acétate de sodium ont été supprimés et remplacés par quelques sels nitriques et ammoniacaux. Les milieux étaient amenés à pH 6,5.

Au premier repiquage, nous avons ensemencé également des milieux de pH 7,0, mais le développement étant meilleur à pH 6,5, nous avons poursuivi la série des repiquages, uniquement dans des milieux de pH 6,5.

Toutes les cultures sont ensemencées avec 1 goutte d'une souche en milieu d'entretien, c'est-à-dire asparagine + acétate de sodium.

Nitrate de calcium.

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| Premier repiquage | Cultures très pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Cultures très pauvres. |
| Troisième repiquage | Cultures très pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures très pauvres. |

Nitrate de potassium.

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| Premier repiquage. | Cultures très pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures très pauvres. |
| Troisième repiquage. | Cultures très pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures très pauvres. |

Nitrate de sodium.

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| Premier repiquage | Cultures très pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Cultures très pauvres. |
| Troisième repiquage | Cultures très pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures très pauvres. |

Nitrate d'ammonium.

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage. | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures pauvres. |

Phosphate d'ammonium.

| | |
|-------------------------------|------------------------|
| Premier repiquage. | Cultures très pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Cultures très pauvres. |
| Troisième repiquage. | Cultures très pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures très pauvres. |

Sulfate d'ammonium.

| | |
|------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage. | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage. | Cultures pauvres. |

Remarque : Le changement du pH au cours de la culture est presque nul.

Tous les sels étudiés permettent donc l'entretien d'une culture d'*Euglena klebsii*. La culture est cependant toujours très pauvre.

Euglena klebsii est donc une espèce autotrophe, mais ne se développe qu'avec de grandes difficultés dans les milieux minéraux.

b) NUTRITION ORGANIQUE. ACIDES AMINÉS. — Les acides aminés ont été étudiés dans le même milieu que les sels minéraux à pH 7,0.

Glycocolle. Avec 1 goutte d'une souche en milieu à l'histidine :

| | |
|------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage. | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage. | Cultures pauvres. |

Remarque : Deux autres séries d'expériences à partir des souches en milieu soit à l'asparagine, soit à la leucine, donnent des résultats moins bons.

Alanine. Avec 1 goutte d'une souche en milieu à l'asparagine :

| | |
|------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage. | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage. | Bonnes cultures. |
| Quatrième repiquage. | Bonnes cultures. |
| Cinquième repiquage. | Bonnes cultures. |

Remarque : Sixième semaine : le pH 7,0 (pas de changement).

Valine. Avec 1 goutte d'une souche en milieu à l'histidine :

| | |
|------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage. | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage. | Cultures pauvres. |

Remarque : Deux autres séries d'expériences donnent les mêmes résultats.

Leucine. Avec 1 goutte d'une souche en milieu à l'asparagine :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Bonnes cultures. |
| Quatrième repiquage | Bonnes cultures. |

Remarque : Il n'y a pas de changement du pH au cours de la culture à quatrième et sixième semaines.

Sérine. Avec 1 goutte d'une souche en milieu à l'asparagine :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures pauvres. |

Remarque : Une autre série avec 1 goutte d'une souche en milieu à la leucine donne les mêmes résultats.

Phénylalanine. Trois séries d'expériences avec 1 goutte des souches en milieux, soit à l'asparagine, soit à la leucine, soit à l'histidine, ne donnent pas de culture. Observation : trois mois.

Tyrosine. Trois séries d'expériences avec 1 goutte des souches en milieux, soit à l'asparagine, soit à la leucine, soit à l'alanine. Résultats négatifs.

Tryptophane. Trois séries d'expériences avec 1 goutte des souches en milieux : peptoné, à l'histidine et à la leucine. Résultats négatifs.

Histidine. Avec 1 goutte d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|-------------------------------|-----------------------|
| Premier repiquage | Très bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage | Bonnes cultures. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Bonnes cultures. |

Remarque : Deux autres séries d'expériences avec 1 goutte des souches en milieux, soit à l'asparagine, soit à la leucine, donnent les mêmes résultats. pH 6,8 à la dixième semaine.

Arginine. Avec 1 goutte d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|------------------------------|------------------|
| Premier repiquage | Bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage | Pas de culture. |

Remarque : Une autre série d'expériences avec 1 goutte d'une souche en milieu à la leucine ne donne pas de culture, même au premier repiquage.

Lysine. Avec 1 goutte d'une souche en milieu à la leucine :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures pauvres. |

Remarque : Deux autres séries d'expériences avec I goutte des souches en milieu peptoné et à l'histidine donnent des résultats moins bons.

Deuxième série d'expériences à pH 6,5.

Ensemencement avec I goutte d'une souche en milieu à l'alanine :

| | |
|-------------------------------|-----------------------|
| Premier repiquage | Bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage | Très bonnes cultures. |
| Troisième repiquage | Bonnes cultures. |
| Quatrième repiquage | Bonnes cultures. |

Remarque : La culture dure très longtemps (plus de huit mois), mais après trois mois tous tombent au fond du tube.

Pas de changement du pH aux vingtième, vingt-quatrième, trente-troisième semaines.

Proline. Avec I goutte d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Bonnes cultures. |

Remarque : Une autre série d'expériences avec I goutte d'une souche en milieu à la leucine donne des résultats moins bons.

Acide glutamique. Avec I goutte d'une souche en milieu à l'histidine :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures pauvres. |

Remarque : Deux autres expériences avec I goutte des souches en milieu à l'asparagine donne des résultats moins bons.

Acide aspartique. Quatre séries d'expériences avec I goutte des souches en milieu à l'asparagine, à l'alanine et à l'histidine :

| | |
|------------------------------|-----------------------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres ou très pauvres. |
| Deuxième repiquage | Pas de culture. |

Asparagine. I, cinq séries d'expériences avec des souches en milieux peptoné et à l'alanine donnent de plus ou moins bonnes cultures, à pH 7,6; amené jusqu'au sixième repiquage, parfois meilleures cultures qu'en milieu peptoné.

II, à pH 6,5.

Avec I goutte d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|-------------------------------|------------------|
| Premier repiquage | Bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage | Bonnes cultures. |
| Troisième repiquage | Bonnes cultures. |

Remarque : Il y a acidification du milieu; sixième semaine : pH 6,2; treizième semaine : pH 5,8-6,2; dix-huitième semaine : pH 6,0-6,2 (pH initial 6,5). Les cultures parallèles à pH 7,0 donnent des cultures moins riches. Pas de changement du pH aux sixième et treizième semaines.

III, milieu asparagine + acétate de Na à pH 6,5 (souche milieu à l'alanine);

| | |
|------------------------------|-----------------------|
| Premier repiquage. | Très bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage. | Bonnes cultures. |
| Quatrième repiquage. | Très bonnes cultures. |
| Cinquième repiquage. | Très bonnes cultures. |
| Sixième repiquage. | Bonnes cultures. |

Remarque : Il n'y a pas de changement du pH au cours de la culture. Dixième et douzième semaines : pH 6,5; vingtième semaine : pH 6,3.

Les cultures parallèles en milieu sans acétate de Na donnent des résultats moins bons.

L'alanine, la leucine, l'histidine, la proline, l'asparagine constituent les meilleurs aliments azotés (parmi les acides aminés) pour *E. klebsii*. Le glycocolle, la valine, la sérine, l'acide glutamique sont utilisables.

La phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, l'arginine, l'acide aspartique sont inutilisables.

La lysine, à pH 7,0, ne permet que des cultures très pauvres et à pH 6,5 de très bonnes cultures.

Enfin, l'addition d'acétate de sodium au milieu à l'asparagine améliore le développement des flagellés.

PEPTONES. — Dans le même milieu que pour les expériences précédentes, les acides aminés ont été remplacés par diverses peptones à 2 p. 1.000. Toutes les expériences ont été effectuées à pH 6,5 et 7,0.

Dans les milieux peptonés, les cultures sont variables et n'ont été amenées qu'aux deuxième et troisième repiquages, mais les mêmes peptones ont été étudiées plusieurs fois. Il n'y a pas de changement du pH. L'addition d'acétate de sodium n'améliore pas les cultures. Les milieux à pH 6,5 donnent souvent de meilleurs résultats que ceux à pH 7,0. (En 1930, d'après les expériences produites en milieu peptoné, nous avons conclu que le pH optimum pour cette espèce est 6,5.)

La « peptone de soie », la peptone pancréatique très aminée (M. B. T. A) et la peptone pancréatique 5 C permettent de

bonnes cultures. La peptone pepsique de viande peu dégradée est moins favorable. La peptone favorable et l'asparagine donnent des cultures équivalentes, mais les flagellés restent vivants plus longtemps dans les milieux à l'asparagine.

ESSAIS DE CULTURES A L'OBSCURITÉ.

Nous avons tenté d'obtenir la culture à l'obscurité dans les milieux suivants : à pH 6,5 et 7,0 :

Milieu à l'asparagine + acétate de sodium : résultats négatifs.

Milieu à la peptone 5 C additionné d'acétate, de butyrate, de propionate, de malate, de citrate de sodium : résultats négatifs.

Mêmes résultats négatifs avec mannite, glucose, saccharose.

CONCLUSIONS.

Euglena klebsii est donc une espèce autotrophe, mais les sels minéraux, nitrates, sels d'ammonium ne permettent que des cultures pauvres. Certains acides aminés permettent, au contraire, un développement excellent des cultures. Parmi les peptones, il semble que les plus favorables soient celles qui résultent de l'hydrolyse prolongée des protides. La peptone pepsique de muscles peu dégradée, riche en polypeptides, si favorable aux autres espèces (*E. gracilis*, *E. stellata*), ne constitue pas un bon aliment azoté pour *E. klebsii*.

Euglena anabæna var. *minor*

HISTORIQUE. SOUCHES. MILIEUX D'ENTRETIEN.

Euglena anabæna a été découverte et décrite par F. Mainx (1926). Cet auteur a distingué, en 1928, une variété *minor* de l'espèce en question.

Mainx a réussi à obtenir la culture bactériologiquement pure de cette espèce en milieu à l'extrait de viande de Liebig et à l'éreptone.

Nous avons étudié la souche même de F. Mainx. Comme

milieu d'entretien, nous utilisons le milieu à la peptone pancréatique 5 C comme pour *Euglena gracilis* (v. p. 840).

RÉACTION DU MILIEU. — Dans ce milieu peptoné, nous avons étudié l'influence de la réaction du milieu entre pH 3,5 et pH 8,5.

| | FLAGELLÉS par millimètre cube |
|---|----------------------------------|
| Très bonne culture correspond à une densité de . . | 400 à 500 |
| Bonne culture correspond à une densité de | 45 à 100 |
| Culture pauvre correspond à une densité de | 5 à 45 |
| Culture très pauvre correspond à une densité de . . | Moins de 5. |
| pH 3,5 | Pas de culture. |
| pH 4,0 | Pas de culture. |
| pH 4,5 | Pas de culture. |
| pH 5,0 | Pas de culture. |
| pH 5,5 | Culture pauvre. |
| pH 6,0 | Bonne culture. |
| pH 6,5 | Bonne culture. |
| pH 7,0 | Très bonne culture. |
| pH 7,5 | Bonne culture. |
| pH 8,0 | Bonne culture. |
| pH 8,5 | Culture pauvre. |

Donc possibilité de culture entre pH 5,5 et pH 8,5. Bon développement des cultures entre pH 6,0 et pH 8,0.

Toutes nos expériences ont donc été réalisées à pH 7,0.

NUTRITION A LA LUMIÈRE.

a) NUTRITION MINÉRALE. — *Premiers essais.* — Au cours de nos premières expériences dans le milieu minéral habituel, nous avons étudié comme aliment azoté les sels suivants : nitrate de calcium, nitrate de potassium, nitrate de sodium, nitrate d'ammonium, sulfate d'ammonium et phosphate d'ammonium bi-basique.

Le nitrate de calcium a été essayé sept fois : résultats négatifs.

Nitrate de sodium : premier repiquage pauvre, deuxième négatif (plusieurs expériences).

Nitrate de potassium : négatif (plusieurs expériences).

Nitrate d'ammonium : premier repiquage pauvre, deuxième négatif (plusieurs expériences).

Sulfate d'ammonium : premier repiquage très pauvre, deuxième négatif (plusieurs expériences).

Phosphate d'ammonium : premier repiquage, bonne culture ; deuxième, négatif. Le deuxième repiquage a été tenté plusieurs fois. On a ensemencé plusieurs tubes en même temps chaque fois, même avec X gouttes de culture les résultats ont toujours été négatifs. Les cultures témoins de *Chlamydomonas*, dans le même milieu, donnaient de bons résultats.

Nous avons conclu (1930 d) qu'*Euglena anabæna* var. *minor* était incapable de se multiplier dans les milieux minéraux.

Deuxième série d'essais. — Après quelques mois, nous avons repris ces expériences.

Le milieu employé a été le milieu suivant (milieu de Mainx) : sulfate de magnésium, 0,1 ; phosphate bi-potassique, 0,2 ; chlorure ferrique, 0,0025 ; eau bi-distillée, 1.000 ; aliment azoté, 1 p. 1.000 ; pH 7,0.

Les résultats de cette deuxième série d'essais sont les mêmes que ceux de la première série, sauf pour ce qui concerne le milieu au phosphate d'ammonium.

Dans ce dernier milieu, nous avons obtenu :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Bonnes cultures. |
| Quatrième repiquage | Bonnes cultures. |
| Cinquième repiquage | Bonnes cultures. |
| Sixième repiquage | Bonnes cultures. |
| Septième repiquage | Cultures pauvres. |
| Huitième repiquage | Cultures pauvres. |

Les résultats de notre première série d'essais ont donc été faussés. Nous ne comprenons d'ailleurs pas quelle cause d'erreur a pu intervenir. Nos milieux n'étaient certainement pas toxiques puisque des cultures témoins (*Chlamydomonas*, *Euglena gracilis*) s'y sont parfaitement développées.

Nous devons donc conclure qu'*Euglena anabæna* var. *minor*, qui peut utiliser le phosphate d'ammonium, est un organisme autotrophe.

Nous avons refait des essais avec un milieu au sulfate d'ammonium : résultats négatifs. Nous avons essayé aussi des sels d'ammonium de divers acides organiques : acétate, lactate et succinate d'ammonium ; il y a survie au premier repiquage. Le deuxième repiquage a été impossible. Le citrate d'ammonium n'a pas donné de culture du tout. Ces milieux aux sels organiques d'ammonium permettent la culture d'*Euglena gracilis*,

b) NUTRITION ORGANIQUE. — Dans le milieu indiqué ci-dessus, l'aliment azoté a été fourni sous forme d'acides aminés en solution à 2 p. 1.000, ou à saturation si les acides sont insolubles à cette concentration.

Le milieu était amené à pH 7,0.

Glycocolle. Avec 1 goutte d'une souche en milieu à la proline :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures pauvres. |

Remarque : Trois autres expériences à partir de différentes souches (soit en milieu à la leucine, soit en milieu peptoné) : mêmes résultats.
pH final : seizième semaine 7,0.

Alanine. Avec 1 goutte d'une souche en milieu à la leucine :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures pauvres. |

Remarque : Deux autres essais (souche en milieu peptoné) : mêmes résultats.

pH, pas de changement (cinquième et seizième semaines).

Valine. Avec 1 goutte d'une souche en milieu à la phénylalanine :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures pauvres. |

Remarque : Trois autres expériences (souches soit en milieu peptoné, soit en milieu à la leucine) : mêmes résultats.

Pas de changement de pH à la seizième semaine.

Leucine. Avec 1 goutte d'une souche en milieu à la valine :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Cultures pauvres. |

Remarque : Deux autres séries d'expériences à partir d'une souche en milieu peptoné ont donné des résultats semblables.

Il n'y a pas de changement du pH à la seizième semaine.

Sérine. Avec 1 goutte d'une souche en milieu peptoné :

Premier repiquage : Cultures très pauvres jusqu'à la quatorzième semaine ; la seizième semaine, cultures pauvres ; la dix-septième semaine, cultures très pauvres.

Remarque : Deux autres séries d'expériences avec I goutte (souches en milieux phénylalanine et proline) donnent des résultats moins bons.

Phénylalanine. Avec I goutte d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|-------------------------------|-----------------------|
| Premier repiquage. | Bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage. | Très bonnes cultures. |
| Troisième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Bonnes cultures. |

Remarque : Une autre série d'expériences à partir d'une souche en milieu à l'asparagine donne les mêmes résultats.

Tyrosine. Avec I goutte d'une souche en milieu à la phénylalanine :

| | |
|------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage. | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Pas de culture. |

Remarque : Trois autres séries d'expériences avec I goutte (souches en milieux soit peptoné soit à la proline) donnent les mêmes résultats.

Tryptophane. Trois séries d'expériences sont effectuées avec I goutte ou II gouttes des différentes souches en milieux peptoné, à la phénylalanine et à la proline :

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| Premier repiquage | Pas de culture. |
|-----------------------------|-----------------|

Histidine. Avec I goutte d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|-------------------------------|---|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Pas de culture ; très peu de formes palmelloïdes. |

Arginine. Trois séries d'expériences avec I et II gouttes des souches en milieux peptoné, à la phénylalanine et à la proline :

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| Premier repiquage | Pas de culture. |
|-----------------------------|-----------------|

Lysine. Exactement les mêmes résultats que pour l'arginine.

Proline. Avec I goutte d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage | Bonnes cultures. |
| Troisième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage. | Cultures pauvres. |

Remarque : Le troisième repiquage est effectué deux fois, mais les cultures sont toujours pauvres.

pH, la sixième semaine pas de changement (7,0).

Acide glutamique. Avec 1 goutte d'une souche en milieu phénylalanine :

Premier repiquage . . . Bonnes cultures.

Deuxième repiquage . . . Pas de culture, quelques palmelloïdes.

Remarque : Une autre série d'expériences avec 1 goutte d'une souche en milieu peptoné donne les mêmes résultats.

Acide aspartique. Avec 1 goutte d'une souche en milieu à la phénylalanine.

Premier repiquage Cultures pauvres.

Deuxième repiquage Cultures pauvres.

Troisième repiquage Cultures pauvres.

Quatrième repiquage Cultures pauvres.

Remarque : Une autre série, avec 1 goutte d'une souche en milieu peptoné, donne les mêmes résultats.

ASPARAGINE. — Au cours de nos premiers essais, quatre tentatives de culture d'*E. anabæna* dans un milieu à l'asparagine, à partir d'une souche en milieu peptoné, ne nous avaient donné que des résultats négatifs (H. Dusi, 1930 *d*). Une autre série d'essais nous a donné des résultats positifs et notre erreur a été redressée (H. Dusi, 1931).

Nous avons pu obtenir quatre cultures successives d'*E. anabæna* en milieu à l'asparagine. Le *pH* des cultures est resté à 7,0. Le développement a été assez bon.

Remarque : On voit donc que l'asparagine et la phénylalanine permettent d'assez bonnes cultures d'*Euglena anabæna*; sont utilisables le glycocolle, l'alanine, la valine, la leucine, la proline et l'acide aspartique.

Sont inutilisables : la sérine, la tyrosine, le tryptophane, l'histidine, l'arginine, la lysine, l'acide glutamique.

PEPTONES. — Nous avons essayé quatre peptones :

La soie hydrolysée permet toujours des cultures non abondantes. Les peptones, pepsique de viande, pancréatique 5 C et M. B. T. A., donnent toujours des cultures très riches (plus de 300 flagellés par millimètre cube).

Il n'y a pas de changement du *pH* dans les milieux peptonés (*pH* 7,0 au quatrième mois de culture).

ESSAIS DE CULTURE A L'OBSCURITÉ.

Nous avons tenté la culture à l'obscurité d'*E. anabæna* dans un milieu peptoné (peptone 5 C ou d'arachide) additionné des acides suivants sous forme de leur sel de sodium : acides acétique, butyrique, lactique, pyruvique, glycérophosphorique, succinique, malique, tartrique, citrique : résultats négatifs.

Dans une autre série, nous avons étudié une suite plus complète d'acides gras : acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valériannique, isovalériannique, caproïque, heptylique, octylique, nonylique : résultats négatifs.

Des expériences témoins ont montré que tous ces milieux, sauf ceux aux acides heptylique, octylique et nonylique, permettaient à la lumière un bon développement d'*E. anabæna*.

Dans une troisième série, enfin, nous avons ajouté au milieu peptoné de l'acétate, du propionate, du butyrate et du caproate de sodium, de la glycérine, de la mannite, du glucose et du saccharose. Résultats négatifs à l'obscurité; à la lumière, tous ces milieux ont donné d'abondantes cultures d'*E. anabæna*.

Nous avons enfin ajouté de l'acétate de sodium à divers milieux peptonés à base de peptone pancréatique 5 C, de peptone pepsique de muscle, de peptone pepsique d'arachide. Les résultats ont toujours été négatifs.

CONCLUSION.

Euglena anabæna var. *minor* est donc une espèce difficile à cultiver dans les milieux minéraux. Le phosphate d'ammonium seul nous a donné des cultures. D'autre part, cette espèce assimile relativement peu d'acides aminés. Deux seulement, parmi ceux que nous avons étudiés, constituent un bon aliment azoté.

Les peptones sont très favorables. Enfin, nous ajouterons que la photosynthèse est obligatoire.

Euglena deses Ehrenberg.

HISTORIQUE. SOUCHES. MILIEU D'ENTRETIEN.

Euglena deses a été décrite en 1832 par Ehrenberg qui l'a étudiée plus complètement en 1838. Elle a été revue par Dujardin (1841), Stein (1878), Kent (1880-81), etc.

La première culture pure d'*Euglena deses* a été réalisée par F. Mainx (1924) à qui nous devons notre souche.

Mainx a étudié l'influence de la réaction du milieu de culture (milieu à base d'extrait de Liebig) :

Dans un milieu neutre, très bonne culture; dans un milieu acide (additionné 1/400 d'acide citrique normal), il n'y a pas de culture. Dans un milieu légèrement alcalin (additionné de 1/500 de NaOH normal), très bonne culture. Dans un milieu plus alcalin (additionné de 1/100 de NaOH normal), pas de culture. Mainx n'a pas précisé le pH des milieux.

Mainx a étudié d'autre part, comme aliment azoté, le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium et le nitrate de potassium. Le nitrate de potassium et le sulfate d'ammonium ont permis une multiplication moyenne; le nitrate d'ammonium une multiplication faible. Mainx n'indique toutefois pas le nombre des repiquages qu'il a effectués dans ces milieux.

Il constate qu'*Euglena deses* a besoin de Fer.

D'autre part, Mainx a constaté qu'*E. deses* ne se multiplie pas à la lumière dans des milieux privés de CO₂ : milieux à base de sulfate d'ammonium additionné d'acétate, propionate, butyrate, lactate, malate, citrate et tartrate de K, Na ou Ca et de glucose, saccharose, mannite, glycérine.

Enfin, Mainx a étudié le développement d'*E. deses* dans des milieux organiques. Le « Kaseabkochen-Trypsin-Gelatin » permet de bonnes cultures. La « Trypsin-Pepton » donne de moins bonnes cultures. L'asparagine, l'acide glutamique, la leucine et le glyocolle ne permettent pas de culture du tout.

MILIEU D'ENTRETIEN. — Nous avons utilisé pour l'entretien des

cultures le milieu peptoné qui nous a servi pour *Euglena gracilis* (v. p. 840).

Par la suite, nous avons constaté que l'eau peptonée : Eau distillée 1.000, peptone pancréatique de viande, 2 grammes ; pH 7,0, convenait parfaitement pour l'entretien des souches.

Dans un milieu peptoné, nous avons étudié l'influence de la réaction du milieu. Pour nous :

| | FLAGELLÉS par millimètre cube |
|--|----------------------------------|
| Très bonne culture correspond à une densité de . . . | 87 à 340 |
| Bonne culture correspond à une densité de | 31 à 87 |
| Culture pauvre correspond à une densité de . . . | 3 à 31 |
| Culture très pauvre correspond à une densité de . | Moins de 3. |
| pH 3,5 | Pas de culture. |
| pH 4,0 | Pas de culture. |
| pH 4,5 | Pas de culture. |
| pH 5,0 | Pas de culture. |
| pH 5,5 | Cultures très pauvres. |
| pH 6,0 | Cultures très pauvres. |
| pH 6,5 | Bonnes cultures. |
| pH 7,0 | Bonnes cultures. |
| pH 7,5 | Bonnes cultures. |
| pH 8,0 | Cultures pauvres. |
| pH 8,5 | Pas de culture. |

Dans ces milieux peptonés, le pH ne subit pas de changement au cours du développement des cultures.

NUTRITION A LA LUMIÈRE.

a) NUTRITION MINÉRALE. — *Nitrate de calcium*. — Le milieu suivant a été utilisé :

| | |
|---|--------|
| Ca(NO ₃) ₂ | 1 |
| MgSO ₄ | 0,2 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 |
| KCl | 0,2 |
| Fe ₂ Cl ₆ | 0,0025 |
| Eau bidistillée | 1.000 |
| NaOH, q. s. pour pH 7,0. | |

Lesensemencements ont été faits à partir d'une souche en milieu peptoné, chaque fois avec I, II, III et IV gouttes de culture.

Quatre séries d'expériences ont été réalisées qui ont toutes

donné les mêmes résultats : Il y a simplement survie des flagellés introduits par l'ensemencement, survie qui peut dépasser deux mois (les tubes ont été suivis pendant quatre mois). Jamais un repiquage n'a été possible.

Nitrate de sodium. — Dans le milieu indiqué ci-dessus, le nitrate de calcium a été remplacé par le nitrate de sodium. Les expériences ont été conduites de la même façon et ont donné exactement les mêmes résultats avec le nitrate de sodium qu'avec le nitrate de calcium

Nitrate de potassium. — Ce corps a donné à Mainx de bons résultats.

Première série d'essais : Nous avons utilisé tout d'abord le milieu de Mainx :

| | |
|---|--------|
| KNO ₃ | 1 |
| MgSO ₄ | 0,1 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,2 |
| Fe ₂ Cl ₆ | 0,0025 |
| Eau bidistillée | 1.000 |
| pH 7,0. | |

Premier repiquage. Souche en milieu peptoné. Ensemencement avec I, III et IV gouttes de culture : pas de culture (survie).

Ensemencement avec V gouttes : très faible multiplication.

Deuxième repiquage (II et III gouttes) : pas de culture.

Deuxième série d'essai : Milieu de Günther (1928) :

| | |
|---|---------|
| KNO ₃ | 0,5 |
| MgSO ₄ | 0,25 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,25 |
| KCl | 0,20 |
| CaSO ₄ | 0,50 |
| Fe ₂ Cl ₆ | Traces. |
| Eau distillée | 1.000 |
| pH 7,0. | |

Premier repiquage. Ensemencement avec III gouttes de culture en milieu peptoné : culture très pauvre.

Deuxième repiquage (avec III et V gouttes) : survie, pas de culture.

Troisième repiquage : 0.

Troisième série d'essais : Milieu de Sachs :

| | |
|--|---------|
| KNO ₃ | 1,0 |
| MgSO ₄ | 0,5 |
| Ca(H ₂ PO ₄) ₂ | 0,5 |
| CaSO ₄ | 0,5 |
| NaCl | 0,5 |
| Fe ₂ Cl ₆ | Traces. |
| Eau distillée | 1.000 |
| pH 7,0. | |

Premier repiquage. Ensemencement avec III gouttes d'une culture en milieu peptoné : survie.

Deuxième repiquage : 0.

Quatrième série d'essais : Même milieu (de Sachs) sans NaCl. Résultats identiques à ceux de la troisième série.

Nitrate d'ammonium. Dans le milieu indiqué p. 865 le nitrate de calcium a été remplacé par le nitrate d'ammonium.

Quatre séries d'expériences ont été réalisées, qui ont toutes donné des résultats négatifs.

Phosphate d'ammonium. $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$. Même milieu que précédemment. Trois séries d'expériences ont donné des résultats négatifs.

Sulfate d'ammonium. Première série : Même milieu que précédemment. Trois séries d'essais donnent des résultats négatifs.

Deuxième série : Dans le milieu suivant :

| | |
|--|--------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 1 |
| MgSO_4 | 0,1 |
| K_2HPO_4 | 0,1 |
| CaCl_2 | 0,1 |
| Fe_2Cl_6 | 0,0025 |
| Eau bidistillée | 1.000 |
| pH 7,0. | |

Résultats négatifs.

Remarques : Pour tous ces milieux, des tubes témoins ont été ensemencés avec *Chlamydomonas agloëformis* ou *Euglena gracilis*, parfois les deux. *Chlamydomonas agloëformis* s'est développé dans tous les milieux, *Euglena gracilis* dans le milieu au nitrate de potassium et aux sels d'ammonium.

D'autre part, en faisant l'ensemencement des milieux minéraux, on ensemait toujours un milieu peptoné qui a constamment donné d'excellents résultats (vérification de l'ensemencement).

Donc, dans aucun milieu normal où l'aliment azoté était fourni, soit sous forme d'un nitrate, soit sous forme d'un sel d'ammonium, nous n'avons pu obtenir de multiplication d'*Euglena deses*; parfois nous avons obtenu une légère survie des flagellés ensemencés (premier repiquage à partir d'un milieu peptoné).

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Mainx qui a obtenu un « développement moyen » dans des milieux minéraux où l'aliment azoté était représenté soit par du nitrate de potas-

sium, soit par du sulfate d'ammonium. Mais Mainx n'indique malheureusement pas le nombre de repiquages qu'il a effectués, et s'il s'est contenté d'observer le premier, surtout si l'ensemencement a été fait largement, ses conclusions ont pu être faussées.

Il est évidemment très délicat de tirer une conclusion d'expériences négatives.

Cependant, pour chacun des corps que nous avons étudiés, nous avons réalisé plusieurs séries d'expériences à des moments variés. D'autre part, dans tous les milieux essayés, nous avons ensemencé des flagellés témoins qui s'y sont développés.

Nous nous croyons donc en droit de conclure qu'*Euglena deses* ne peut se développer à la lumière dans des milieux minéraux où l'aliment azoté est fourni sous forme d'un nitrate ou d'un sel d'ammonium.

b) NUTRITION ORGANIQUE. — Nous avons essayé comme aliment azoté un certain nombre d'acides aminés et de peptones.

Toutes les expériences ont été réalisées dans le milieu à la peptone p. 865 où le nitrate de calcium était remplacé par les corps à étudier à la concentration de 2 p. 1.000, ou à saturation s'ils ne sont pas solubles à cette concentration.

Tous les milieux étaient ajustés à pH 7,0.

Glycocolle. Quatre séries d'expériences avec I et II gouttes (souche en milieu peptoné et à l'alanine) : pas de culture (observé pendant quatre mois).

Alanine. Avec II gouttes d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage. | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage. | Bonnes cultures. |
| Quatrième repiquage. | Bonnes cultures. |

Remarque : Il n'y a pas de changement du pH la septième et la treizième semaines.

Valine. Avec II gouttes d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|-----------------------------|-------------------|
| Premier repiquage. | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Pas de culture. |

Remarque : Une autre série d'expériences donne exactement les mêmes résultats.

Une autre série avec I goutte d'une souche en milieu à l'alanine. Premier repiquage : pas de culture.

Leucine. Avec II gouttes d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Bonnes cultures. |
| Troisième repiquage | Bonnes cultures. |
| Quatrième repiquage | Bonnes cultures. |

Remarque : Une autre série d'expériences en hiver a donné des résultats moins bons. Une série avec I goutte d'une souche en milieu à l'alanine a donné de bonnes cultures.

pH 7,0 à la septième semaine.

Sérine. 1^o Avec II gouttes d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Bonnes cultures. |
| Quatrième repiquage | Cultures pauvres. |

2^o Avec I goutte d'une souche en milieu à l'alanine :

| | |
|-----------------------------|------------------|
| Premier repiquage | Bonnes cultures. |
|-----------------------------|------------------|

Remarque : Pas de changement du pH la septième semaine.

Phénylalanine. Quatre séries d'expériences avec I et II gouttes (souche en milieu peptoné, à l'alanine et à la sérine) : pas de culture du tout.

Tyrosine. Avec II gouttes d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage | Pas de culture. |

Remarque : Le troisième repiquage a été effectué deux fois avec I et II gouttes : tous les résultats sont négatifs.

Tryptophane, Histidine et Arginine. Ensemencement avec I goutte d'une souche en milieu à l'acide glutamique : pas de culture.

Remarque : Ces trois substances n'ont été étudiées qu'une fois. Les résultats ne sont donc pas certains.

Lysine. Ensemencement avec I goutte d'une souche en milieu à l'acide glutamique :

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Premier repiquage | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage | Bonnes cultures. |
| Troisième repiquage | Cultures pauvres. |
| Quatrième repiquage | Bonnes cultures. |

Remarque : pH 7,3 la septième semaine.

Proline. Avec I goutte d'une souche en milieu à l'acide glutamique :

| | |
|------------------------------|-----------------------|
| Premier repiquage. | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Très bonnes cultures. |
| Troisième repiquage. | Très bonnes cultures. |

Remarque : pH 7,0 la septième semaine. Le développement optima est aux environs des troisième et quatrième semaines ; cinquième semaine : décroissance.

Acide aspartique. Ensemencement avec II gouttes d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|------------------------------|-----------------------|
| Premier repiquage. | Cultures pauvres. |
| Deuxième repiquage. | Cultures pauvres. |
| Troisième repiquage. | Bonnes cultures. |
| Quatrième repiquage. | Très bonnes cultures. |

Remarque : Septième semaine, pas de changement du pH.

Acide glutamique. Ensemencement avec II gouttes d'une souche en milieu peptoné :

| | |
|------------------------------|-----------------------|
| Premier repiquage. | Très bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage. | Bonnes cultures. |
| Troisième repiquage. | Bonnes cultures. |
| Quatrième repiquage. | Très bonnes cultures. |

Remarque : Septième semaine, pas de changement du pH.

Asparagine. Ensemencement avec I goutte d'une souche en milieu à l'acide aspartique :

| | |
|------------------------------|-----------------------|
| Premier repiquage. | Bonnes cultures. |
| Deuxième repiquage. | Très bonnes cultures. |
| Troisième repiquage. | Très bonnes cultures. |
| Quatrième repiquage. | Très bonnes cultures. |

Remarque : Cinq autres séries d'expériences (ensemencement avec I et II gouttes de souches en milieu peptoné) ont permis de bonnes cultures. Septième semaine, pas de changement du pH.

Remarques : L'alanine, la leucine, la lysine, la proline, l'acide glutamique, l'acide aspartique et l'asparagine constituent de bons aliments azotés pour *Euglena deses*.

Le glycocolle, la valine, la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, l'arginine et l'histidine sont inutilisables. Remarquons toutefois que les quatre derniers corps n'ont été essayés qu'une fois.

Nos résultats ne sont d'accord que sur un seul point avec ceux de Mainx : impossibilité pour *E. deses* d'utiliser le glyco-

colle. Mainx considère la leucine, l'acide glutamique et l'asparagine comme inutilisables. Pour nous, ces composés permettent l'entretien d'une souche d'*E. deses* et sont donc parfaitement assimilables.

PEPTONES. — Les peptones pancréatiques de viande, digestion peu poussée et très poussée (S. C. et M. B. T. A.), permettent d'excellentes cultures d'*Euglena deses*, indéfiniment repiquables.

La soie hydrolysée (un seul repiquage) a donné à plusieurs reprises des cultures de densité moyenne, moins bonnes qu'avec les autres peptones.

La peptone pepsique de viande ne nous a donné que des cultures pauvres (un seul repiquage).

ESSAIS DE CULTURES A L'OBSCURITÉ.

Nous avons tenté la culture à l'obscurité d'*E. deses*, en milieu peptoné additionné de divers corps carbonés organiques (milieu de pH 7,0).

Les corps suivants ont été essayés : acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valériannique, isovalériannique, caproïque, heptylique, octylique, nonylique, pyruvique, glycérophosphorique, succinique, malique, tartrique, citrique ; mannite, glucose, saccharose et glycérine.

A l'obscurité, pas de culture (plusieurs séries d'expériences négatives).

A la lumière, tous les milieux peptonés ont permis de bonnes cultures, sauf ceux additionnés des acides citrique, caproïque, heptylique, octylique et nonylique.

Euglena deses peut cependant vivre très longtemps à l'obscurité. Des cultures ayant séjourné plus de deux mois en l'absence de lumière, et qui ne se sont pas multipliées, peuvent être repiquées et se multiplier à la lumière.

E. deses ne se multiplie donc pas à l'obscurité. Cette conclusion est en accord avec celle de Bracher (1919) qui a noté, dans les conditions naturelles, l'importance de la lumière pour cette espèce.

CONCLUSION.

Euglena deses est donc incapable de se multiplier dans un milieu purement minéral (aliment azoté: nitrates, sels d'ammonium). Il faut lui fournir un aliment organique, soit une peptone, soit un acide aminé. *Euglena deses*, au point de vue de sa nutrition azotée, rentre donc dans la catégorie des mésotrophes, ainsi que les a définis A. Lwoff (1932): « organismes capables de faire la synthèse de leurs protides à partir de NH_3 et ayant besoin d'un composé organique ».

Mais nous tenons à faire remarquer dès maintenant que nous rencontrons pour la première fois, parmi les *Euglènes*, et, d'une manière beaucoup plus générale, parmi les organismes vivants, un organisme à chlorophylle, doué de photosynthèse et ayant besoin de substances organiques.

Euglena pisciformis.

HISTORIQUE. SOUCHE. MILIEU D'ENTRETIEN.

Euglena pisciformis a été décrite par Klebs en 1883. La première culture bactériologiquement pure de cette espèce a été réalisée par F. Mainx (1924).

Mainx a étudié dans un milieu à base d'extrait de Liebig l'influence de la réaction du milieu (1928). Les cultures sont bonnes dans les milieux neutres ou additionnés de 1/500 de solution NaOH normale (pH non indiqué). Pas de cultures dans les milieux acides contenant 1/100 ou 1/400 de solution normale d'acide citrique, ou très alcaline (renfermant 1/100 de solution normale de NaOH), pH non indiqué.

Mainx a constaté d'autre part que le nitrate de calcium permet de bonnes cultures (multiplication lente), le sulfate d'ammonium et l'extrait de viande, de très bons développements.

Mainx a obtenu également une culture pauvre dans un milieu neutre au nitrate de potassium, une culture pauvre dans un milieu à la leucine, pas de culture dans des milieux

au glyocolle, à l'acide glutamique et à l'asparagine. Le milieu à la trypsine-peptone et à « la trypsine-gélatine » ont permis aussi le développement.

La souche que nous avons étudiée est la souche isolée par F. Mainx.

MILIEU D'ENTRETIEN. — Comme milieu d'entretien, nous avons utilisé le milieu suivant :

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Sulfate de magnésium | 0,2 |
| Phosphate monopotassique. | 0,2 |
| Chlorure de potassium | 0,2 |
| Perchlorure de fer | 0,0025 |
| Peptone pepsique de viande | 2 |
| Eau distillée | 1.000 |
| NaOH, q. s. pour pH 7,0. | |

Nous avons étudié l'influence de la réaction du milieu sur le développement d'*E. pisciformis*.

Pour ces expériences, la peptone pepsique a été remplacée par la peptone pancréatique M. B. T. A.

| | FLAGELLÉS par millimètre cube |
|--|----------------------------------|
| Très bonne culture correspond à une densité de . . | 90 à 410 |
| Bonne culture correspond à une densité de | 40 à 90 |
| Culture pauvre correspond à une densité de | 4 à 40 |
| Culture très pauvre correspond à une densité de . | Moins de 4. |
| pH 3,5 | Pas de culture. |
| pH 4,0 | Pas de culture. |
| pH 4,5 | Pas de culture. |
| pH 5,0 | Pas de culture. |
| pH 5,5 | Pas de culture. |
| pH 6,0 | Cultures pauvres. |
| pH 6,5 | Bonnes cultures. |
| pH 7,0 | Bonnes cultures. |
| pH 7,5 | Bonnes cultures. |
| pH 8,0 | Bonnes cultures. |
| pH 8,5 | Bonnes cultures. |

Dans notre note préliminaire (1930^c) nous avons indiqué que pH 8,0 constituait la limite permettant le développement. Par la suite nous avons pu obtenir trois repiquages successifs dans des milieux à pH 8,5.

Il n'y a pas de changement de pH dans les milieux du fait du développement des flagellés.

NUTRITION A LA LUMIÈRE.

a) NUTRITION MINÉRALE. — Dans le milieu ci-dessus indiqué, nous avons remplacé la peptone par divers nitrates et sels d'ammonium (1/1.000). pH 7,0.

Nitrate de calcium. Quatre séries d'essais ont donné des résultats entièrement négatifs. Les ensemencements ont été faits chaque fois avec I, III et IV gouttes de culture en milieu peptoné. Jamais il n'y a eu de culture au premier repiquage.

Nitrate de potassium. Deux séries d'essais dans le même milieu et une série d'essais dans le milieu de Sachs (voir p. 866) : Résultats négatifs.

Nitrate de sodium. Deux séries d'essais : Résultats négatifs.

Nitrate d'ammonium. Quatre séries d'essais : Résultats négatifs.

Phosphate d'ammonium. Trois séries d'essais : Résultats négatifs.

Sulfate d'ammonium. Deux séries d'essais dans le même milieu. Ensemencement avec I et III gouttes de culture : Résultats négatifs.

Une série d'essais dans le même milieu additionné de chlorure de calcium 0,1 p. 1.000 :

| | |
|------------------------------|----------------------|
| Premier repiquage | Culture pauvre. |
| Deuxième repiquage. | Culture très pauvre. |
| Troisième repiquage. | Impossible. |

Une série d'essais dans le milieu de Mainx a donné des résultats négatifs

Dans tous ces milieux, nous avons ensemencé des cultures-témoins de *Chlamydomonas agloëformis* et *Hæmatococcus pluviæ* qui ont donné de très bonnes cultures. D'autre part, dans les milieux aux sels d'ammonium, nous avons ensemencé *Euglena gracilis* dont les cultures se sont bien développées.

b) NUTRITION ORGANIQUE. — *Acides aminés.* — Dans le milieu d'entretien indiqué p. 873, nous avons remplacé la peptone par divers acides aminés (2 p. 1.000 ou à saturation si le corps n'est pas soluble à 2 p. 1.000), pH 7,0.

Nous avons étudié :

Le glycocolle, l'alanine, la valine, la leucine, la sérine, la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, l'histidine, l'argi-

nine, la lysine, la proline, l'acide aspartique et l'acide glutamique, l'asparagine.

Pour chacun de ces corps, nous avons réalisé plusieurs séries d'expériences. A chaque fois, nous ensemencions plusieurs tubes avec I ou II gouttes de culture en milieu peptoné.

Tous les acides aminés ont donné les mêmes résultats : Il n'y a jamais eu multiplication; parfois une légère survie des formes palmelloïdes.

Comme pour les milieux aux nitrates et aux sels d'ammonium, nous avons ensemencé des cultures-témoins d'autres Euglènes (*E. gracilis*, *stellata*, *klebsii*, *deses*, *anabæna*).

PEPTONES. — Nous avons étudié, toujours dans le même milieu duquel nous avons supprimé la peptone pepsique de viande, la valeur alimentaire de divers produits d'hydrolyse de protides :

Soie hydrolysée. — Avec cette « peptone » nous avons réalisé six essais successifs (ensemencement avec 1 à V gouttes de culture en milieu peptoné); il n'y a jamais eu de culture; parfois une survie de flagellés ensemencés. Le deuxième repiquage a toujours été négatif. Des tubes témoins du même milieu ensemencés avec les autres espèces d'Euglènes ont donné de bonnes cultures.

Peptone de muscle ayant subi une digestion pancréatique poussée (M. B. T. A.). — Cette peptone permet de bonnes cultures d'*E. pisciformis*, indéfiniment repiquables (3 repiquages).

Peptone de muscle ayant subi une digestion pancréatique peu poussée (5 C.). — Cette peptone donne des résultats légèrement supérieurs à la peptone M. B. T. A. (4 repiquages).

Peptone de muscle ayant subi une digestion pepsique peu poussée. — Cette peptone donne les meilleurs résultats pour la culture d'*E. pisciformis* : les cultures sont très riches.

ESSAIS DE CULTURE A L'OBSCURITÉ.

Nous avons réalisé avec *E. pisciformis* les mêmes expériences qu'avec *E. deses* : Essais de culture à l'obscurité en milieu peptoné, tel quel ou additionné d'acides organiques ou de glucides divers. Les expériences ayant été faites exactement dans les mêmes conditions que pour *E. deses*, nous croyons inutile de donner une liste des milieux.

Tous nos essais ont été entièrement négatifs.

E. pisciformis ne peut donc vivre qu'à la lumière.

CONCLUSIONS.

On voit donc par ce qui précède qu'il nous a été impossible d'obtenir une culture d'*Euglena pisciformis* dans des milieux où l'aliment azoté était représenté soit par un nitrate, soit par un sel d'ammonium, soit par un acide aminé quelconque, soit par la « soie hydrolysée ».

Nous nous trouvons, comme dans le cas d'*Euglena deses*, en présence d'expériences à résultat négatif. Comme pour cette dernière espèce, nous avons pris, pour *E. pisciformis*, de multiples précautions : répétition des essais, ensemencement de plusieurs tubes avec des doses variables de culture, et surtout ensemencement dans des tubes de milieux témoins d'autres espèces-témoins : *Chlamydomonas agloëformis*, *Haematococcus pluvialis*, et plusieurs espèces d'Euglènes. Ceci pour vérifier la non-toxicité des milieux et la valeur des conditions physiques : lumière et température en particulier.

Il est toutefois possible que ces résultats négatifs soient dus à la carence du milieu en une substance activante agissant à très faible dose. On sait, en effet, que de tels éléments sont indispensables à certains protozoaires parasites, mais on ne connaît jusqu'ici aucun exemple d'action d'un tel ordre chez les protozoaires libres.

Nous nous croyons donc en droit de conclure qu'*Euglena pisciformis* est incapable de se nourrir : 1° de nitrates; 2° de sels d'ammonium; 3° d'acides aminés divers; 4° de soie hydrolysée. Seules peuvent servir d'aliment azoté pour *E. pisciformis* les peptones complexes résultant de l'hydrolyse pepsique ou trypsique de protides complexes.

Malgré la présence de chlorophylle et de chlorophylle active — puisque nous avons vu que la lumière est indispensable à *E. pisciformis* — cette espèce possède le même besoin azoté que les organismes métatrophes de A. Lwoff : le cilié *Glaucoma piriformis* (A. Lwoff, 1923-1932), les trypanosomides appartenant aux genres *Leptomonas* et *Strigomonas* (M. Lwoff, 1929-1932).

**Comparaison des diverses Euglènes.
Conclusions générales.**

RÉACTION DU MILIEU.

Les diverses espèces d'Euglènes que nous avons étudiées sont très inégalement sensibles au pH du milieu de culture.

Les résultats de nos expériences sont résumés dans le tableau ci-dessous. Nous rappelons que les expériences relatives à la réaction du milieu ont été réalisées dans des milieux peptonés.

Il apparaît d'emblée :

1° Que les limites inférieure et supérieure de concentration des ions H , compatibles avec le développement, sont variables pour chaque espèce;

2° Que l'étendue des différences de pH supportées par chaque espèce est variable;

3° Que l'étendue de la zone de pH permettant un bon développement est également variable.

**TABLEAU I. — Développement des cultures des Euglènes
étudiées à des pH différents.**

| pH . . . | 3,0 | 3,5 | 4,0 | 4,5 | 5,0 | 5,5 | 6,0 | 6,5 | 7,0 | 7,5 | 8,0 | 8,5 |
|-------------------------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-----|-----|-----|
| <i>E. gracilis</i> | ————— | | | | | | | | | | | |
| <i>E. stellata</i> | | | | | ——— | | | | | | | |
| <i>E. klebsii</i> | | | | | | | ————— | | | | | |
| <i>E. anabæna</i> | | | | | | | ————— | | | | | |
| <i>E. deses.</i> | | | | | | | | ————— | | | | |
| <i>E. pisciformis</i> | | | | | | | | | ————— | | | |

En traits pleins, zones permettant un bon développement des cultures. En pointillé, zones où les cultures sont pauvres.

LIMITES INFÉRIEURE ET SUPÉRIEURE. — L'espèce qui supporte le pH le plus bas, qui peut se multiplier dans des milieux de pH 3,0, est *Euglena gracilis*.

Nous avons vu (p. 564) que les flagellés peuvent rester vivants et mobiles dans les milieux de pH 9,6, mais il nous est impossible de dire si la multiplication a lieu à des pH si élevés.

Le tableau ci-dessous met en évidence la caractéristique de chaque espèce.

TABLEAU II. — Limites inférieures et supérieures des cultures.

| | LIMITE INFÉRIEURE | LIMITE SUPÉRIEURE |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>E. gracilis</i> | 3,0 | 8,5 |
| <i>E. stellata</i> | 4,5 | 8,0 |
| <i>E. klebsii</i> | 4,0 | 8,5 |
| <i>E. anabæna</i> | 5,5 | 8,5 |
| <i>E. deses</i> | 5,5 | 8,0 |
| <i>E. pisciformis</i> | 6,0 | 8,5 |

Pour les organismes qui se multiplient à pH 8,5, la limite supérieure n'a pas été établie.

Ce tableau met d'autre part bien en évidence l'étendue des variations supportées par les Euglènes.

Ici encore, c'est *Euglena gracilis* qui peut se multiplier dans la zone la plus étendue : de 3,0, limite inférieure, à plus de 8,5. Puis vient *Euglena klebsii* (4,0 à plus de 8,5).

L'espèce la plus exigeante est *Euglena deses* qui ne peut se multiplier qu'entre pH 5,5 et 8,0.

pH optimum. — Enfin, et c'est là un point très important lorsqu'on veut étudier la nutrition des organismes, la zone permettant un bon développement est d'importance variable.

Très étendue pour *Euglena gracilis*, elle est au contraire très réduite pour *E. stellata*.

D'une manière générale, nous pouvons dire que, sauf pour *E. stellata*, qui ne se multiplie bien qu'aux environs de pH 5,5, toutes les autres espèces étudiées possèdent une zone commune de pH favorable, comprise entre 6,5 et 7,0.

Remarques. — Pour divers auteurs, le pH optimum pour les bactéries et les champignons varie suivant la nature de l'aliment fourni (Dernby 1924, Bach 1925).

Nous n'avons pas étudié spécialement cette question, mais au cours de nos expériences nous n'avons rien constaté de semblable pour les Euglènes.

Une seule exception est à signaler pour *E. stellata* qui, en milieu peptoné, se multiplie très lentement à pH 7,0, et ne donne que des cultures très pauvres, mais qui, en milieu à la lysine, se développe aussi abondamment à pH 7,0 qu'à pH 5,5.

Au point de vue de leur sensibilité à la réaction du milieu, les Euglènes comprennent donc, comme les bactéries, des espèces euryionique et sténoïonique.

BESOINS EN CALCIUM.

Au point de vue des besoins minéraux, nous n'avons pu, dans les conditions où nous avons opéré, mettre en évidence une différence notable de comportement qu'en ce qui concerne le calcium.

Euglena stellata, seule, a besoin d'une quantité notable de calcium.

NUTRITION A LA LUMIÈRE.

NUTRITION MINÉRALE. — Les résultats de nos expériences sont résumés dans le tableau ci-dessous.

On voit, d'une manière générale, que les nitrates sont moins favorables que les sels d'ammonium.

TABLEAU III. — Nutrition minérale des Euglènes.

| | <i>E. gracilis</i> | <i>E. stellata</i> | <i>E. klebsii</i> | <i>E. anabana</i> | <i>E. deses</i> | <i>E. pisciformis</i> |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| Nitrate de calcium | 0 | + | + | 0 | 0 | 0 |
| Nitrate de potassium | + | | + | 0 | 0 | 0 |
| Nitrate de sodium | + | + | + | 0 | 0 | 0 |
| Nitrate d'ammonium | ++ | + | + | 0 | 0 | 0 |
| Phosphate d'ammonium | ++ | | + | + | 0 | 0 |
| Sulfate d'ammonium | ++ | | + | 0 | 0 | 0 |

0, inutilisable; +, utilisable; ++, très favorable.

Pour ce qui concerne les nitrates, deux espèces seulement peuvent assimiler le nitrate de calcium : *E. stellata* et *E. klebsii*.

Les sels d'ammonium (nitrate, phosphate, sulfate) constituent de bons aliments azotés pour *E. gracilis* et sont assimilables par *E. klebsii*.

E. anabana n'a pu être cultivée que dans un milieu au phosphate d'ammonium.

E. deses et *E. pisciformis* ne peuvent se multiplier dans des milieux où l'aliment azoté est représenté soit par un nitrate, soit par un sel d'ammonium.

ACIDES AMINÉS. — Il convient tout d'abord de mettre à part *E. pisciformis* qui n'assimile aucun acide aminé.

En ce qui concerne les autres espèces, nous pouvons dire que chacune d'elles possède des propriétés particulières qui ont été résumées dans les chapitres spéciaux et qui sont mises en évidence dans le tableau ci-dessous :

Tout d'abord, l'asparagine est favorable pour toutes les espèces, *sauf pour E. pisciformis*.

TABLEAU IV. — Nutrition des Euglènes aux dépens des acides aminés.

| | <i>E. gracilis</i> | <i>E. stellata</i> | <i>E. klebsii</i> | <i>E. anabana</i> | <i>E. deses</i> | <i>E. pisciformis</i> |
|--|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|
| Glycocolle | ++ | ++ | + | + | 0 | 0 |
| Alanine droite | ++ | ++ | ++ | + | ++ | 0 |
| Valine racémique | ++ | + | + | + | 0 | 0 |
| Leucine gauche | ++ | ++ | ++ | + | ++ | 0 |
| Sérine racémique | + | ++ | + | 0 | + | 0 |
| Phénylalanine racémique | ++ | 0 | 0 | ++ | 0 | 0 |
| Tyrosine gauche | ++ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tryptophane gauche | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Histidine (monochlorhydrate) | ++ | ++ | ++ | 0 | 0 | 0 |
| Arginine droite (basique) | 0 | + | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lysine droite (monochlorhydrate) | 0 | ++ | ++ | 0 | ++ | 0 |
| Proline racémique | + | ++ | ++ | + | ++ | 0 |
| Acide glutamique droit | + | + | + | 0 | ++ | 0 |
| Acide aspartique gauche | + | + | 0 | + | ++ | 0 |
| Asparagine gauche | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | 0 |

0, inutilisable; +, utilisable; ++, très favorable.

La proline, la leucine, l'alanine sont utilisables par toutes les espèces (sauf *E. pisciformis*).

La phénylalanine est un bon aliment azoté pour *E. gracilis* et *anabæna*; elle est inutilisable par *E. klebsii* et *E. deses*.

L'histidine est un bon aliment azoté pour *E. gracilis*, *stellata* et *klebsii*. Il est inutilisable par *E. anabæna* et *deses*.

La lysine est très favorable pour *E. stellata* et inutilisable pour *E. gracilis* et *anabæna*.

L'acide aspartique est favorable pour *E. deses* et inutilisable par *E. klebsii*.

Chacun des autres acides aminés possède une valeur plus ou moins grande pour les diverses espèces (voir tableau).

Le tryptophane seul est inutilisable. Il est d'ailleurs très peu soluble dans les milieux de culture.

Pour nous, la tyrosine est un mauvais aliment azoté pour toutes les espèces que nous avons étudiées. Pour Thornton et Smith (1913), au contraire, la tyrosine favorise considérablement la culture d'*E. viridis*. Ces auteurs ont d'ailleurs expérimenté avec des cultures impures.

PEPTONES. — D'une manière générale, nous pouvons dire que les « peptones » constituent les meilleures sources azotées pour la nutrition des Euglènes à la lumière.

On peut dire que les peptones, résultant de l'hydrolyse peptique ou trypsique ménagée de muscle, sont d'excellents aliments azotés.

La soie hydrolysée donne les mêmes résultats que les pep-

TABLEAU V. — Nutrition azotée de quelques Euglènes à la lumière.

| | NITRATES | SELS d'ammonium | ACIDES aminés | PEPTONES |
|---|----------|--------------------|------------------|----------|
| <i>Euglena gracilis</i> . . . | + | ++ | ++ | ++ |
| <i>Euglena stellata</i> . . . | + | + | ++ | ++ |
| <i>Euglena klebsii</i> | + | + | ++ | ++ |
| <i>Euglena anabæna</i> . . . | 0 | + | ++ | ++ |
| <i>Euglena deses</i> | 0 | 0 | ++ | ++ |
| <i>Euglena pisciformis</i> . . | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 0, inutilisable; +, utilisable; ++, très favorable. | | | | |

tones de viande pour *E. gracilis*. Pour les autres espèces, elle donne des résultats un peu moins bons. Elle est inutilisable pour *E. pisciformis*.

Enfin, nous noterons que, pour *E. klebsii*, les peptones ne sont pas supérieures à l'asparagine.

DÉFINITION PHYSIOLOGIQUE DES ESPÈCES.

On voit par tout ce qui précède que chacune des espèces que nous avons étudiées possède des caractères particuliers :

La réaction du milieu de culture, la nécessité des sels de calcium, l'assimilation plus ou moins facile de nitrates et de sels d'ammonium, la possibilité d'utilisation de tel ou tel acide aminé, peuvent servir à différencier les diverses formes.

Avant que ces caractères physiologiques puissent être donnés comme caractères généraux d'une espèce, il faudra évidemment étudier de nombreuses souches de cette espèce.

La nutrition azotée et carbonée des Euglènes.

(Discussion.)

DÉFINITIONS. — Nous adoptons la classification physiologique de A. Lwoff et utiliserons les termes dans l'acception qu'il leur a donnée :

Le « *pouvoir de synthèse* » d'un organisme est défini par la nature des composés azotés les plus simples indispensables à sa croissance et à sa multiplication.

Les organismes *autotrophes* sont les organismes à nutrition azotée et carbonée minérale.

Les *phototrophes* seront les organismes utilisant le carbone du CO_2 grâce à l'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle.

Les organismes *mésotrophes* peuvent faire la synthèse de leurs constituants à partir de NH_3 et ont besoin d'un composé organique.

Les organismes *métatrophes* sont incapables d'effectuer la synthèse de tous leurs acides aminés à partir de NH_3 . Une source azotée organique complexe (« peptone ») leur est nécessaire.

Certaines espèces d'Euglènes sont photoautotrophes, c'est-à-dire peuvent vivre à la lumière dans un milieu purement minéral (*E. gracilis*, *E. stellata*, *E. klebsii*).

D'autres ont besoin de lumière (*phototrophie*) et d'un aliment organique simple [acide aminé] (*mésotrophie*). Ce sont les photo-mésotrophes *E. deses*.

Enfin *E. pisciformis*, en plus de la lumière, a besoin des mêmes peptones complexes nécessaires aux métatrophes : *photométatrophie*.

Donc, au point de vue de leur nutrition azotée, les Euglènes que nous avons étudiées appartiennent à trois types différents :

Les unes sont autotrophes comme la grande majorité des espèces à chlorophylle, c'est-à-dire peuvent utiliser les nitrates; il faut cependant remarquer que certaines espèces, comme *E. anabæna*, ne peuvent utiliser les nitrates, mais ont besoin de sels d'ammonium.

Les autres sont mésotrophes comme la chlamydomonadine *Polytoma uvella* qui possède un plaste, mais est dépourvue de chlorophylle (leucophytes A. Lwoff).

Les autres, enfin, sont métatrophes comme les protozoaires *s. s.* Des peptones complexes, résultant de l'hydrolyse pepsique ou trypsique ménagée de protides, leur sont nécessaires, exactement comme elles sont nécessaires au cilié *Glaucoma piriiformis* (A. Lwoff, 1923-32), aux trypanosomides *Strigomonas oncopelti*, *Leptomonas ctenocephali* (M. Lwoff, 1929-32).

Nous arrivons ainsi à la conclusion que des organismes à chlorophylle peuvent avoir besoin, à la lumière, de substances organiques, simples ou complexes.

Cette conclusion est en opposition avec les faits généralement admis relativement au pouvoir de synthèse des organismes à chlorophylle qui sont tenus pour autotrophes. Elle est en opposition aussi avec les conclusions particulières de F. Mainx relatives aux Euglènes. Mainx admet que toutes les Euglènes à chlorophylle sont autotrophes. Il constate bien que, dans la nature, *E. deses* ne se trouve que dans des eaux riches en matières organiques et admet qu'elle ne peut vivre dans les eaux pures à cause de la concurrence des algues.

Cependant, Mainx entretient toutes ses cultures d'Euglènes dans des milieux à base d'extrait de Liebig, et il ne trouve

pour *E. deses* (que nous considérons comme mésotrophe) qu'une très faible multiplication dans les milieux minéraux, probablement au premier repiquage seulement.

Pour Mainx, cet insuccès est dû à l'existence de substances toxiques, tels que les métaux lourds, dans les milieux synthétiques, substances toxiques auxquelles certaines espèces seraient particulièrement sensibles.

Pour nous, les choses sont autres. Nous n'avons pas réussi à cultiver *E. deses* et *E. pisciformis* dans des milieux minéraux. Nous avons fait de multiples essais et avons toujours ensemencé des organismes témoins dans nos milieux.

Si ces Euglènes ne se multiplient pas dans les milieux minéraux, c'est qu'elles ont besoin de substances organiques simples ou complexes, et ce, malgré la présence de chlorophylle, et malgré même la nécessité de la lumière.

Si l'on réfléchit que la fonction chlorophyllienne consiste en la fixation du CO_2 atmosphérique grâce à l'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle, on concevra sans peine qu'il n'y a aucune raison d'admettre *a priori* que cette nutrition carbonée doive obligatoirement entraîner la possibilité d'utiliser un aliment azoté minéral, c'est-à-dire que l'autotrophie soit obligatoirement liée à la phototrophie.

Il y a donc, pour nous, dissociation de la nutrition carbonée et azotée. La mésotrophie et la métatrophie peuvent être associées à la phototrophie. Le fait que des organismes à chlorophylle ont besoin de substances organiques (acides aminés ou peptones) pourrait suffire à lui seul à justifier cette conclusion. D'autres faits concernant l'oxytrophie des Leucophytes viennent apporter à cette manière de voir un appui important.

L'oxytrophie, telle que l'a définie A. Lwoff, est un mode très particulier de nutrition, caractérisé par la nécessité d'un aliment carboné organique indépendant, quel que soit l'aliment azoté, et même si celui-ci est une « peptone » suffisante pour assurer la multiplication indéfinie d'organismes métatrophes tels que le cilié *Glaucoma piriformis* ou le trypanosomide *Strigomonas oncopelti*. L'oxytrophie s'oppose à l'haplotrophie.

La nutrition carbonée des oxytrophes ne peut être assurée que par des acides gras inférieurs à chaîne linéaire. L'oxytrophie ne se rencontre que chez les « leucophytes » à l'exclusion des

bactéries et des champignons. Elle est, ainsi que l'a établi A. Lwoff, liée à l'existence d'un plaste et à l'absence de chlorophylle.

Or, au point de vue de leur pouvoir de synthèse, les deux organismes oxytrophes que nous connaissons présentent des différences considérables. L'un est mésotrophe : *Polytoma unvella* ; l'autre est métatrophe, race physiologique stable d'*Euglena gracilis* cultivée à l'obscurité.

Des organismes présentant une nutrition carbonée, que nous pouvons considérer comme identiques, peuvent donc avoir des besoins azotés très différents.

Nous devons donc considérer que, chez les organismes à chlorophylle, comme chez tous les organismes en général, il y a une certaine indépendance de la nutrition carbonée et de la nutrition azotée.

Evidemment, chez les organismes à chlorophylle, la réduction des nitrates est liée à l'assimilation chlorophyllienne. Ceci est vrai, non seulement pour les plantes supérieures, mais aussi pour les Chlorophytes.

D'une manière générale, nous pouvons dire que si, chez les Chlorophytes, la possibilité de réduire les nitrates est liée à la présence de la chlorophylle, la présence de la chlorophylle ne conditionne pas obligatoirement la possibilité d'utiliser les nitrates, ni même les sels d'ammonium ou les acides aminés comme unique aliment azoté. Nous devons donc considérer la fonction chlorophyllienne et le pouvoir de synthèse comme deux variables indépendantes, en tenant compte toutefois des remarques faites au sujet des nitrates.

L'étude de la nutrition à l'obscurité des diverses espèces d'Euglènes confirme encore cette conception.

Seule de toutes les espèces que nous avons étudiées, *Euglena gracilis* peut se multiplier à l'obscurité. La lumière est indispensable à *Euglena stellata*, *klebsii*, *anabæna*, *deses* et *pisciformis*.

Aucun acide, aucun glucide ne peut remplacer l'assimilation chlorophyllienne. Tout se passe comme si une réaction aboutissant à la synthèse d'un corps indispensable était liée à la photosynthèse comme lui est liée, chez les Chlorophytes, l'assimilation des nitrates.

Il y a donc chez les Euglènes des espèces obligatoirement phototrophes, d'autres chez lesquelles la phototrophie n'est nécessaire que lorsque l'aliment azoté est minéral. Il est évident que ce sont ces dernières seulement qui pourront donner les formes, espèces ou variétés, décolorées que l'on rencontre dans la nature.

On ne possède malheureusement sur la nutrition de ces formes blanches aucun renseignement, pas plus sur leur nutrition azotée que sur leur nutrition carbonée, leur culture bactériologiquement pure n'ayant jamais été réussie.

On peut d'ailleurs prévoir que ce seront des organismes oxy-métatrophes comme la race physiologique stable d'*Euglena gracilis* cultivée à l'obscurité.

Si nous résumons les caractères des Euglènes au point de vue de la fonction chlorophyllienne, nous voyons : 1° que certaines espèces ont perdu leur chlorophylle ; 2° que d'autres possèdent une chlorophylle particulièrement fragile qui peut être expérimentalement supprimée ; 3° que d'autres, enfin, ne peuvent vivre sans l'assimilation chlorophyllienne. Chez ces mêmes formes, la disparition de la chlorophylle entraînerait la disparition de l'espèce.

Cette perte du pigment chlorophyllien peut influencer le pouvoir de synthèse. Ainsi, *Euglena gracilis*, autotrophe à la lumière, devient métatrophe à l'obscurité. (Remarquons que *Polytoma uvella*, dépourvue de chlorophylle, est mésotrophe comme aussi *Chlamydomonas agloëformis* et *Hæmatococcus pluvialis*, privés de l'assimilation chlorophyllienne). Mais le pouvoir de synthèse peut aussi subir des modifications indépendantes de toute modification, au moins apparente, de l'appareil chlorophyllien.

C'est ainsi que l'on constate chez les Euglènes une tendance à la disparition de la possibilité d'utiliser les nitrates comme unique aliment azoté. Lorsque l'aliment azoté est un nitrate, la croissance des espèces autotrophes est plus lente que lorsque l'aliment azoté est un sel d'ammonium.

Certaines espèces même, qui peuvent utiliser des sels d'ammonium, sont incapables de se multiplier dans des milieux à base de nitrate, telle *Euglena anabæna*.

D'autres, comme *E. deses*, sont incapables d'utiliser les sels

d'ammonium et ont besoin d'un acide aminé. Enfin, *E. pisciformis* est incapable de se nourrir aux dépens d'un seul acide aminé et a besoin de « peptones ».

Il n'est pas besoin de rappeler ici les multiples raisons théoriques et expérimentales qui ont conduit les protistologues à considérer les organismes à chlorophylle comme les ancêtres des formes blanches. Se basant sur l'existence de cette évolution morphologique, A. Lwoff a admis une évolution physiologique qui est une dégradation, c'est-à-dire un passage d'une potentialité donnée de synthèse à une potentialité moindre. Nous retrouvons chez les Euglènes, groupe monophylétique, toutes les étapes de cette évolution — passage de l'autotrophie à la mésotrophie et à la métatrophie.

La diminution du pouvoir de synthèse, la tendance à la disparition de la chlorophylle, sont pour nous autant de symptômes de cette dégradation physiologique.

Ce qui fait, pour le moment, la singularité des Euglènes, ce n'est pas la perte de la chlorophylle — que l'on rencontre dans d'autres groupes : Chrysomonadines, Chlamydomonadines, Péridiniens, etc. — c'est l'évolution du pouvoir de synthèse chez des organismes conservant leur chlorophylle. Ce phénomène n'est probablement pas particulier aux Euglènes et on peut prévoir qu'on le retrouvera dans les groupes en évolution comme ceux que nous venons de nommer et dont l'étude physiologique nous paraît devoir donner des résultats fort intéressants.

TRAVAUX CITÉS

- Pour le complément de la bibliographie, consulter les mémoires et ouvrages suivants : Mainx (1928), Doflein-Reichenow (1929), A. Lwoff (1932).
 1931. ALEXANDER (G.), The significance of hydrogen ion concentration in the biology of *Euglena gracilis* Klebs. *Biol. Bull.*, **61**, p. 165-184.
 1925. BACH (D.), Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. *Thèse Fac. Sciences Paris*.
 1928. BELAR (K.), Untersuchung der Protozoen. PETERFI, *Methodik der wiss. Biologie*, **1**, p. 175.
 1926. BERTHELOT (A.), Remarque sur l'emploi des milieux synthétiques. *Ces Annales*, **40**, p. 440-446.
 1919. BRACHER (R.), Observations on *Euglena Deses*. *Ann. Bot.*, **33**, p. 98-108.
 1925. CHATTON (E), *Pansporella perplexa*. *Ann. Sc. Nat. Zool.*, **8**, p. 5.
 1901. DANGEARD (A. P.), Recherches sur les Euglénienens. *Le Botaniste*, **8**, p. 97-360.

1921. DERNBY (K. G.), La concentration optima en ions H favorisant le développement de certains microorganismes. Ces *Annales*, **35**, p. 277-290.
1929. DOFLIN (F.) et REICHENOW (E.), *Lehrbuch der Protozoenkunde*. G. Fischer, Jena.
1841. DUJARDIN (F.), *Histoire naturelle des zoophytes infusoires*, Paris.
1930. a) DUSI (H.), Les limites de la concentration en ions H pour la culture d'*Euglena gracilis*. *C. R. Soc. Biol.*, **103**, p. 1184.
1930. b) DUSI (H.), La nutrition autotrophe d'*Euglena gracilis* Klebs aux dépens de quelques corps azotés inorganiques. *C. R. Soc. Biol.*, **104**, p. 662.
1930. c) DUSI (H.), Les limites de la concentration en ions H pour la culture de quelques Euglènes. *C. R. Soc. Biol.*, **104**, p. 734.
1930. d) DUSI (H.), Pouvoir de synthèse de quelques Euglènes : Euglènes autotrophes et Euglènes hétérotrophes. *C. R. Soc. Biol.*, **105**, p. 837.
1931. DUSI (H.), L'assimilation des acides aminés par quelques Euglénien. *C. R. Soc. Biol.*, **107**, p. 1232.
1838. EHRENBURG (Chr. G.) : *Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen*. Berlin.
1928. a) ELMORE (M. E.), Antigenic properties of *Euglena gracilis*. *Journ. of Immunol.*, **15**, p. 21-32.
1928. b) ELMORE (M. E.), Anaphylaxis. VIII. The production of anaphylaxis with *Euglena gracilis* and certain other unicellular chlorophyll-bearing organism. *Journ. of Immunol.*, **15**, p. 33-36.
1928. GUNTHER (F.), Ueber den Bau und die Lebensweise der Euglenen, besonders der Arten *E. terricola*, *geniculata*, *proxima*, *sanguinea* und *lucens* nov. spec. *Arch. f. Protistenk.*, **60**, p. 541-590.
1929. JAHN (Th. L.), Studies on the physiology of the Euglenoid flagellates. I. The relation of the density of population to the growth rate of *Euglena*. *Biol. Bull.*, **57**, p. 81-106.
1931. JAHN (Th. L.), Studies on the physiology of the Euglenoid flagellates. III. The effect of hydrogen ion concentration on the growth of *Euglena gracilis* Klebs. *Biol. Bull.*, **61**, p. 387-399.
- 1880-1881. KENT, SAVILLE (W.), *A manual of the infusoria*, **1**, London.
- 1885-1886. KHAWKINE (W.), Recherches biologiques sur l'*Astasia⁴ocellata* n. sp. et l'*Euglena viridis* Ehrbg. *Ann. Sc. nat. Zool.*, 6^e série, **19**, p. 1-48 et 7^e série, **1**, p. 319-376.
1833. KLEBS (G.), Ueber die Organisation einiger Flagellatengruppen und ihre Beziehungen zu anderen Infusorien. *Unters. Bot. Inst. Tübingen*, **1**, p. 233-362.
1921. KOSTIR (W. G.), The comparative resistance of different species *Euglenidæ* to citric acid. *Ohio Journ. of Sc.*, **21**, p. 8.
1930. KUFFERATH (H.), La culture des Algues. *La Revue algologique*, Paris.
1924. KUSTER (E.), *Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen*. Leipzig.
1915. LINSBAUER (K.), Notiz über die Säureempfindlichkeit der Euglenen. *Oesterr. bot. Zeitsch.*, **65**, p. 12-21.
1923. LWOFF (A.), Sur la nutrition des Infusoires. *C. R. Ac. Sc.*, **176**, p. 928.
1924. LWOFF (A.), Le pouvoir de synthèse d'un Protiste hétérotrophe, *Glaucoma piriformis*. *C. R. Soc. Biol.*, **91**, p. 344.
1929. LWOFF (A.), La nutrition de *Polytoma uvella* Ehrbg et le pouvoir de synthèse des protistes hétérotrophes. Les protistes mésotrophes. *C. R. Ac. Sc.*, **188**, p. 114.

1932. LWOFF (A.), Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires, *Monographies de l'Institut Pasteur*, Paris.
1929. LWOFF (A.) et DUSI (H.), Le pouvoir de synthèse d'*Euglena gracilis* cultivée à l'obscurité. *C. R. Soc. Biol.*, **102**, p. 567.
1931. LWOFF (A.) et DUSI (H.), La nutrition azotée et carbonée d'*Euglena gracilis* en culture pure à l'obscurité. *C. R. Soc. Biol.*, **107**, p. 1068.
1929. LWOFF (A.) et LWOFF (M.), Le pouvoir de synthèse de *Chlamydomonas agloformis* et d'*Hæmatococcus pluvialis* en culture pure à l'obscurité. *C. R. Soc. Biol.*, **102**, p. 569.
1928. LWOFF (M.), Influence du degré d'hydrolyse des matières protéiques sur la nutrition de *Leptomonas ctenocephali* Fanth. *in vitro*. *C. R. Soc. Biol.*, **94**, p. 240.
1930. LWOFF (M.), Un Flagellé parasite hétérotrophe : *Leptomonas oncopelti* Noguchi et Tilden. *C. R. Soc. Biol.*, **105**, p. 835.
1931. LWOFF (M.), Culture de *Strigomonas (Leptomonas) fasciculata* (Trypanosomide) en présence de corps à fonction peroxydasique. *C. R. Soc. Biol.*, **107**, p. 1428.
1924. MAINX (F.), Kulture und Physiologie einiger Euglena-Arten. *Lotos (Prag)*. **72**, p. 239-247.
1926. MAINX (F.), Einige neue Vertreter der Gattung Euglena Ehrbg. *Arch. f. Protistenk.*, **54**, p. 150-161.
1928. MAINX (F.), Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Eugleninen, I et II. *Arch. f. Protistenk.*, **60**, p. 305-414.
1917. NAKANO (H.), Untersuchungen über die Entwicklungs- und Ernährungsphysiologie einiger Chlorophyceen. *Journ. Coll. Sc., Impr. Univ. Tokyo*, **40**, p. 1-214.
1913. PRINGSHEIM (E. G.), Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. II. Zur Physiologie der *Euglena gracilis*. *Beitr. z. Biol. d. Pflanzen*, **12**, p. 1-47.
1926. PRINGSHEIM (E. G.), Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. V. Methoden und Erfahrungen. *Beitr. z. Biol. d. Pflanzen*, **14**, p. 283-312.
1878. STEIN (F. R. V.), Der Organismus der Infusionsthiere, Abt. 3, Heft 1, Leipzig.
1923. TANNREUTHER (G. W.), Nutrition and reproduction in *Euglena*. *Arch. f. Entwicklungsmech. d. Organismen*, **52**, p. 367-383.
1912. TERNETZ (Ch.), Beiträge zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, **51**, p. 435-514.
1915. THORNTON (H. G.) et SMITH (G.), On the nutritive condition determining the growth of certain Fresh Water and Soil Protista. *Proc. R. Soc. London*, series B, **88**, p. 151-165.
1917. TURNER (C. L.), A culture medium for *Euglena* with notes on the behavior of *Euglena*. *Anal. Rec.*, **12**, p. 407-413.
1899. ZUMSTEIN (H.), Zur Morphologie und Physiologie der *Euglena gracilis* Klebs. *Thèse Leipzig. Jahrb. wiss. Bot.*, **34**, 1900, p. 174.

P.-S. — Pendant l'impression de ce mémoire, il a paru dans *Archiv. für Protistenkunde* (t. 79, p. 239) [un mémoire de R. P. HALL intitulé : « On the relation of hydrogen-ion concentration to the growth of *Euglena anabæna* var. *minor* and *E. deses* »]. Avec les mêmes souches que nous avons étudiées, Hall a repris d'une façon différente les expériences relatives à l'influence du pH du milieu sur la croissance des deux euglènes. Cet auteur est en

accord général avec nos résultats exposés dans une note précédente (1930 c). Depuis lors, nous avons vu que les zones permettant les cultures sont un peu plus étendues (v. le présent mémoire). Il n'y a en définitive qu'une petite différence avec les résultats récents de Hall : il a observé une certaine multiplication d'*E. anabæna*, dans des milieux de pH compris entre 5,5 et 4,5, alors que nous n'avons jamais rien obtenu dans cette zone.

Les expériences de Hall à l'obscurité donnent, pour *E. anabæna*, une multiplication beaucoup moindre qu'à la lumière, et pour *E. deses*, presque rien; confirmation de nos résultats sur la nécessité absolue de la lumière pour ces deux espèces. Nous avons noté que les euglènes qui ont besoin de lumière peuvent pousser quelque temps à l'obscurité; 2 ou 3 repiquages sont possibles, avec diminution progressive des cultures.

Ainsi, grâce aux travaux de Hall, quelques-uns de nos résultats se trouvent confirmés et précisés.

ERRATA

- H. Dusi : Mémoire I, Ces *Annales*, 50, p. 572. Deux titres ont été omis : Recherches personnelles. Nutrition minérale.
S. et WINOGRADSKY, Ces *Annales*, 50, p. 406 et suiv. au lieu de antarctique, antarctica lire : arctique, artica.

TABLE DES MATIÈRES

DU TOME I

| | |
|--|-----|
| Sur le mécanisme de l'infection tuberculeuse expérimentale (<i>deuxième mémoire</i>). Surinfections exogènes et surinfections endogènes, par A. BOQUET. . | 5 |
| De l'importance de la valeur antigène de l'anatoxine dans la vaccination antidiphtérique. Parallélisme entre le pouvoir floculant et le pouvoir immunisant, par G. RAMON et P. NÉLIS | 66 |
| Du rôle de différents facteurs intervenant dans l'immunisation active contre la diphtérie au moyen de l'anatoxine, par P. NÉLIS | 79 |
| L'allergie hémorragique (<i>deuxième mémoire</i>). Relations entre le phénomène de Schwartzman et le phénomène d'Arthus, par André GRATIA et Roger LINZ . . | 89 |
| Cinq années de pratique de la vaccination préventive de la tuberculose par le BCG dans l'arrondissement de Thann (Haut-Rhin), par G. KERN | 106 |
| La vaccination préventive de la tuberculose par le BCG à la Compagnie des Mines de Béthune. Résultats de six années d'application, par Ph. BREHON | 109 |
| Opacification du cristallin survenue chez des lapins en cours d'immunisation antiherpétique, par S. NICOLAU et M ^{me} L. KOPCIOWSKA. | 117 |
| Recherches sur le sérum et sa température critique (<i>septième mémoire</i>). La conductivité électrique du sérum en fonction de la température, par P. LECOMTE DU NOUY | 127 |
| † M. René VALLERY-RADOT | 143 |
| L'infection tuberculeuse spontanée du cobaye et du lapin, par A. CALMETTE. | 148 |

| | |
|---|-----|
| La méthode d'hémoculture du virus tuberculeux et ses résultats, par le professeur E. LÆWENSTEIN | 161 |
| Études sur l'ultravirus tuberculeux (<i>deuxième mémoire</i>). Les protogènes du virus tuberculeux, avec les planches I, II, III et IV, par G. SANARELLI et A. ALESSANDRINI | 167 |
| Nouvelles recherches expérimentales sur la syphilis. Cycle évolutif du virus syphilitique, neurosyphilis, virulence du <i>Treponema pallidum</i> , par C. LEVADITI, A. VAISMAN, M ^{lle} R. SCHÖEN et J.-G. MEZGER | 222 |
| Méthode de dosage de l'anticorps ovalbuminique dans le sang des sujets allergiques au blanc d'œuf, par Pierre WORINGER. | 270 |
| Une expérience de prophylaxie sociale de la tuberculose par la vaccination BCG à Brest, par J. QUERANGAL DES ESSARTS et M ^{me} G. DE CARBONNIÈRES DE SAINT-BRICE. | 282 |
| Vaccinations BCG dans les départements français en 1930, 1931 et 1932. | 287 |
| Sur la vaccination BCG par voie buccale chez les adolescents et les adultes non allergiques, par A. CALMETTE. | 289 |
| Sur les sérums antilytiques, par les D ^{rs} Jules BORDET et Ernest RENAUX. | 299 |
| Variations du <i>B. coli</i> et hétérogénéité des principes lytiques correspondants, par André GRATIA | 306 |
| Sur le mécanisme de l'infection charbonneuse, par A. BOQUET et A. SAENZ. | 314 |
| La prophylaxie antidiphthérique par la vaccination au moyen de l'anatoxine dans une ville de la banlieue parisienne (Boulogne-sur-Seine), par Suzanne DREYFUS. | 339 |
| Recherches sur l'importance des sulfates comme engrais, par Gabriel BERTRAND et L. SILBERSTEIN. | 344 |
| Études sur la microbiologie du sol (<i>septième mémoire</i>). Nouvelles recherches sur les organismes de la nitrification, par S. WINOGRADSKY, en collaboration avec Hélène WINOGRADSKY (avec planches V et VI) | 350 |

| | |
|--|-----|
| Sur l'immunité para-spécifique conférée par le BCG, par A. CALMETTE et A. SAENZ | 433 |
| La vaccination associée (antitypho-paratyphoïdique et antidiphthérique) dans l'armée, par M. DOPTER. . . . | 446 |
| Nouvelle contribution à l'étude des éléments filtrables du virus tuberculeux, par C. NINNI | 504 |
| Sur la valeur des procédés de laboratoire pour le dia- gnostic de leishmaniose canine naturelle, par Paul GIRAUD et Henri CABASSU | 539 |
| Recherches sur la nutrition de quelques euglènes. I. <i>Euglena gracilis</i> , par Hisatake DUSI | 550 |
| Étude expérimentale d'un bacille tuberculeux d'origine humaine cultivé pendant vingt-deux années consé- cutives sur milieu bilié, par A. CALMETTE, C. GUÉ- RIN et L. NÈGRE | 599 |
| Diversité des principes autolytiques, par Ernest RENAUX. | 604 |
| Recherches sur la préparation du sérum antistreptococ- cique, par L. COTONI, E. CÉSARI et M ^{lle} N. CHAMBRIN. | 608 |
| Spécificité de la réaction allergique comme procédé de diagnostic de la mélitococcie ovine, par le D ^r Ch. DUBOIS | 632 |
| Recherches expérimentales sur la pathogénie de la méningite cérébro-spinale et sur la virulence des méningocoques, par le professeur ZDRODOWSKI . . . | 651 |
| Étude sur les propriétés fermentatives des sarcines, par Jan SMIT (avec planches VII, VIII, IX, X, XI) . . . | 675 |
| Recherches sur le cycle évolutif et la culture d' <i>Amoeba</i> <i>diploidea</i> Hartmann et Nagler (1908), par R. DES- CHIENS (avec planche XII) | 695 |
| Sur les conditions de culture et le pouvoir de synthèse de <i>Saprolegnia</i> Sp. Étude qualitative de l'alimenta- tion carbonée, azotée et sulfurée, par Michel WOL- KONSKY | 703 |
| Contribution à la chimiothérapie du paludisme. Essais sur les calfats (<i>deuxième mémoire</i>), par E. FOUR- NEAU, M. et M ^{me} J. TRÉFOUEL, Daniel BOVET et M ^{lle} C. BENOIT | 731 |
| Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1932, par Jules VIALA | 745 |

| | |
|---|-----|
| Contribution à l'étude de l'influence des injections répétées de BCG sur les singes, par I. M. LÉVITAN et D. D. LOKHOFF | 749 |
| Contribution à l'étude du diagnostic bactériologique de la diphtérie, par E. PIASECKA-ZEYLAND. | 754 |
| Recherches sur la constitution du Laccol, par Gab. BERTRAND et Georges BROOKS | 763 |
| La rage autochtone en Afrique Occidentale française (planche en couleurs), par S. NICOLAU, C. MATHIS et Val. CONSTANTINESCO | 778 |
| Recherches sur la nutrition de quelques Euglènes (<i>deuxième mémoire</i>), par H. DUSI | 840 |

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME L

| | | |
|---|---|-----|
| ALESSANDRINI (A.). | Voir Sanarelli (G.). | |
| BENOIT (M ^{lle} C.) | Voir Fourneau (E.). | |
| BERTRAND (Gabriel) et BROOKS (Georges). | Recherches sur la constitution du Lac- col | 763 |
| BERTRAND (Gabriel) et SIL- BERSTEIN (L.) | Recherches sur l'importance des sul- fates comme engrais. | 344 |
| BOQUET (A.) | Sur le mécanisme de l'infection tuber- culeuse expérimentale (<i>deuxième mé- moire</i>). Surinfections exogènes et surinfections endogènes | 5 |
| BOQUET (A.) et SAENZ (A.). . | Sur le mécanisme de l'infection char- bonneuse | 311 |
| BORDET (D ^r Jules) et RENAUX (Ernest) | Sur les sérums antilytiques | 299 |
| BOVET (Daniel) | Voir Fourneau (E.). | |
| BREHON (Ph.) | La vaccination préventive de la tuber- culose par le BCG à la Compagnie des Mines de Béthune. Résultats de six années d'application | 109 |
| BROOKS (Georges) | Voir Bertrand (Gabriel). | |
| CABASSU (Henri). | Voir Giraud (Paul). | |
| CALMETTE (A.). | L'infection tuberculeuse spontanée du cobaye et du lapin | 148 |
| — | Sur la vaccination BCG par voie buccale chez les adolescents et les adultes non allergiques | 289 |
| CALMETTE (A.), GUÉRIN (C.) et NÈGRE (L.) | Étude expérimentale d'un bacille tu- berculeux d'origine humaine cultivé pendant vingt deux années consécu- tives sur milieu bilié. | 599 |
| CALMETTE (A.) et SAENZ (A.). | Sur l'immunité para-spécifique con- férée par le BCG, | 433 |

CARBONNIÈRES DE SAINT-BRICE

| | | |
|---|--|-----|
| (M ^{me} de) | Voir Quérangal des Essarts (J.). | |
| CÉSARI (E.) | Voir Cotoni (L.). | |
| CHAMBRIN (M ^{lle} N.) | Voir Cotoni (L.). | |
| CONSTANTINESCO (Val.) | Voir Nicolau (S.). | |
| COTONI (L.), CÉSARI (E.) et CHAMBRIN (M ^{lle} N.) | Recherches sur la préparation du sérum antistreptococcique. | 608 |
| DESCHIENS (R.) | Recherches sur le cycle évolutif et la culture d' <i>Amoeba diploidea</i> Hartman et Nagler [1908] (avec planche XII) | 695 |
| DOPTER (M.) | La vaccination associée (antitypho-paratyphoïdique et antidiphthérique) dans l'armée | 446 |
| DREYFUS (Suzanne) | La prophylaxie antidiphthérique par la vaccination au moyen de l'anatoxine dans une ville de la banlieue parisienne (Boulogne-sur-Seine) | 339 |
| DUBOIS (D ^r Ch.) | Spécificité de la réaction allergique comme procédé de diagnostic de la mélitococcie ovine | 632 |
| DUSI (Hisatake) | Recherches sur la nutrition de quelques Euglènes. I. <i>Euglena gracilis</i> | 550 |
| — | Recherches sur la nutrition de quelques Euglènes (deuxième mémoire). | 840 |
| FOURNEAU (E.), TREFOUEL (M. et M ^{me} J.), BOVET (Daniel) et BENOIT (M ^{lle} C.) | Contribution à la chimiothérapie du paludisme. Essais sur les calfats (deuxième mémoire). | 734 |
| GIRAUD (Paul) et CABASSU (Henri) | Sur la valeur des procédés de laboratoire pour le diagnostic de la leishmaniose canine naturelle. | 539 |
| GRATIA (André) | Variations du <i>B. coli</i> et hétérogénéité des principes lytiques correspondants. | 306 |
| GRATIA (André) et LINZ (Roger) | L'allergie hémorragique (deuxième mémoire). Relations entre le phénomène de Schwartzmann et le phénomène d'Arthus | 89 |
| GUÉRIN (C.) | Voir Calmette (A.). | |
| KERN (G.) | Cinq années de pratique de la vaccination préventive de la tuberculose par le BCG dans l'arrondissement de Thann (Haut-Rhin) | 106 |
| KOPCIEWSKA (M ^{me} L.) | Voir Nicolau (S.). | |

| | | |
|--|--|-----|
| LECOMTE DU NOUY (P. et M.).. | Recherches sur le sérum et sa température critique (<i>septième mémoire</i>). La conductivité électrique du sérum en fonction de la température. | 127 |
| LEVADITI (C.), VAISMAN (A.), SCHEN (M ^{lle} R.) et MEZGER (J. G.) | Nouvelles recherches expérimentales sur la syphilis. Cycle évolutif du virus syphilitique, neurosyphilis, virulence du <i>Treponema pallidum</i> | 222 |
| LÉVITAN (I. M.) et LOKHOFF (D. D.) | Contribution à l'étude de l'influence des injections répétées de BCG sur les singes | 749 |
| LINZ (Roger) | Voir Gratia (André). | |
| LEWENSTEIN (E.) | La méthode d'hémoculture du virus tuberculeux et ses résultats | 164 |
| LOKHOFF (D. D.) | Voir Lévitane (I. M.). | |
| MATHIS (C.) | Voir Nicolau (S.). | |
| MEZGER (J. G.) | Voir Levaditi (C.). | |
| NÈGRE (L.) | Voir Calmette (A.). | |
| NÉLIS (P.) | Du rôle de différents facteurs intervenant dans l'immunisation active contre la diphtérie au moyen de l'anatoxine | 79 |
| — | Voir Ramon (G.). | |
| NICOLAU (S.) et KOPCIEWSKA (M ^{me} L.) | Opacification du cristallin survenue chez des lapins en cours d'immunisation antiherpétique. | 417 |
| NICOLAU (S.), MATHIS (C.) et CONSTANTINESCO (Val.) . . . | La rage autochtone en Afrique Occidentale française (planche en couleurs). | 778 |
| NINNI (C.) | Nouvelle contribution à l'étude des éléments filtrables du virus tuberculeux | 504 |
| PIASECKA-ZEYLAND (E.) . . . | Contribution à l'étude du diagnostic bactériologique de la diphtérie. . . | 734 |
| QUERANGAL DES ESSARTS (J.) et CARBONNIÈRES DE SAINT- BRICE (M ^{me} G. de) | Une expérience de prophylaxie sociale de la tuberculose par la vaccination BCG à Brest | 282 |
| RAMON (G.) et NÉLIS (P.) . . | De l'importance de la valeur antigène de l'anatoxine dans la vaccination antidiphtérique. Parallélisme entre le pouvoir flocculant et le pouvoir immunisant. | 66 |

| | | |
|--|---|-----|
| RENAUX (Ernest). | Diversité des principes autolytiques . . | 604 |
| — | Voir Bordet (D ^r Jules). | |
| SAENZ (A.) | Voir Boquet (A.). | |
| — | Voir Calmette (A.). | |
| SANARELLI (G.) et ALESSAN- | | |
| DRINI (A.) | Études sur l'ultravirus tuberculeux (deuxième mémoire). Les protogènes du virus tuberculeux, avec les plan- | |
| | ches I, II, III et IV. | 167 |
| SCHÖEN (M ^{lle} R.) | Voir Levaditi (C.). | |
| SILBERSTEIN (L.) | Voir Bertrand (Gabriel). | |
| SMIT (Jan). | Étude sur les propriétés fermentatives des sarcines (avec planches VII, VIII, IX, X, XI). | 675 |
| TREFOUEL (M. et M ^{me}). . . . | Voir Fourneau (E.). | |
| | Vaccinations BCG dans les départe- | |
| | ments français en 1930, 1931 et 1932. . | 287 |
| VAISMAN (A.) | Voir Levaditi (C.). | |
| † VALLERY-RADOT (M. René). | | 443 |
| VIALA (Jules) | Les vaccinations antirabiques à l'Ins- | |
| | titut Pasteur en 1932. | 745 |
| WINOGRADSKY (Hélène). . . . | Voir Winogradsky (S.). | |
| WINOGRADSKY (S.) | Études sur la microbiologie du sol (sep- | |
| | tième mémoire). Nouvelles recherches sur les organismes de la nitrification, en collaboration avec Hélène Wino- | |
| | gradsky, avec planches V et VI). . . . | 350 |
| WOLKONSKY (Michel). | Sur les conditions de culture et le pou- | |
| | voir de synthèse de <i>Saprolegnia</i> Sp. Etude qualitative de l'alimentation | |
| | carbonée, azotée et sulfurée | 703 |
| WORINGER (Pierre). | Méthode de dosage de l'anticorps oval- | |
| | buminique dans le sang des sujets allergiques au blanc d'œuf | 270 |
| ZDRODOWSKI (Prof.) | Recherches expérimentales sur la pa- | |
| | thogénie de la méningite cérébro-spi- | |
| | nale et sur la virulence des méningo- | |
| | coques | 651 |

Le Gérant : G. MASSON.

